

TESIS DOCTORAL

Receptor Bombesina Subtipo 3 y efectos de su ligando sintético en el tejido adiposo: terapia potencial para la obesidad y la diabetes.



Zaida Moreno Villegas

Madrid 2017

UAM
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE MADRID

Dpto. Biología Molecular

iis
FJD

INSTITUTO DE
INVESTIGACIÓN
SANITARIA
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ



Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias

Receptor Bombesina Subtipo 3 y efectos de su ligando sintético en el tejido adiposo: terapia potencial para la obesidad y la diabetes.

Tesis doctoral realizada por:

Zaida Moreno Villegas

Licenciada en Biología

Director: Dra. Nieves González Gómez

Realizada en:





Nieves González Gómez

Laboratorio de Patología Renal, Vascular y Diabetes.
IIS-Fundación Jiménez Díaz
Avda. Reyes Católicos, 2
28040 - Madrid, España
Teléfono: +34 91 550 48 99

E-mail: ngonzalezg@quironsalud.es

Dra. Nieves González Gómez, Investigador Asociado del Laboratorio de Patología Renal, Vascular y Diabetes del Instituto de Investigación Sanitaria-Fundación Jiménez Díaz,

CERTIFICA

Que **Dña. Zaida Moreno Villegas**, Licenciada en Biología por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “***Receptor Bombesina Subtipo 3 y efectos de su ligando sintético en el tejido adiposo: terapia potencial para la obesidad y la diabetes***” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, donde proceda, a los efectos oportunos, se firma la presente en Madrid a 18 de abril de 2017:

Nieves González Gómez

“En la investigación es incluso más importante el proceso que el logro mismo.”

Emilio Muñoz Ruiz

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis, si bien ha requerido de esfuerzo y mucha dedicación por parte de la autora y su directora de tesis, no hubiese sido posible su finalización sin la cooperación desinteresada de todas y cada una de las personas que a continuación citaré, y muchas de las cuales han sido un soporte muy fuerte en momentos de angustia y desesperación.

A mi directora, la Dra. Nieves González, primeramente por decidir acogerme en su grupo y segundo, por guiarme en esta etapa como científica y enseñarme que siempre hay que alejarse del foco de estudio para tener una visión global, con la cual es más fácil poder encontrar soluciones.

A los doctores Raúl Sanz, Sergio Portal y RT. Jensen, siempre colaborando y aconsejando en la investigación.

Quisiera agradecer especialmente, a todas aquellas personas que decidieron firmar un consentimiento informado, cediendo una parte de su cuerpo de manera altruista a la ciencia. Gracias a ellos, la ciencia puede avanzar y en un futuro millones de personas podrás disponer de algún nuevo tratamiento para la obesidad o la diabetes. También quisiera mencionar a las decenas de ratas que, involuntariamente, han donado su vida por el bien de la ciencia.

Mis agradecimientos a Marta, que a pesar de haber llegado al final de esta etapa, su trabajo como técnico de laboratorio es remarcable. Gracias por tu paciencia y tu siempre disposición a ayudar.

Agradecer a mis compañeros, especialmente a Laura, Genztane y Jonay, por toda la ayuda desinteresada que me han prestado y en especial por las charlas científicas o no durante todas esas comidas, a veces a horas intempestivas, con las que siempre lograban hacer desaparecer los problemas.

Pero mi mayor agradecimiento se lo dedico a mis padres, por su paciencia durante estos duros años, intentando comprender las charlas con las que exponía mis problemas surgidos en los experimentos y a pesar de no entender nada, nunca cesar en intentar ayudarme y alentarme a finalizar. Por apoyarme en mis decisiones, ya fueran buenas o malas y por enseñarme a terminar lo empezado. En especial a mi padre, por todo el tiempo y el esfuerzo que también ha invertido en mi tesis. Gracias.

No quisiera terminar sin mostrar mi más sincero agradecimiento a mi pareja, Carlos, por su inestimable apoyo y sobre todo, por su confianza en mi capacidad para finalizar este trabajo animándome a continuar hasta el final. Además, he de alabar su labor como editor estilográfico en este trabajo.

RESUMEN

La obesidad y la diabetes *mellitus* son problemas importantes de salud con un elevado impacto socio-económico y cuya prevalencia continúa incrementándose, tanto a nivel europeo como global. Los tratamientos son escasos y específicamente, los farmacológicos disponibles son muy limitados, por lo que nuevas dianas moleculares eficaces son de elevado interés. Diversos estudios en humanos implican al Receptor Bombesina Subtipo 3 (BRS-3) en ambas patologías y su deficiencia en ratón, conlleva al desarrollo de obesidad y altera el metabolismo de la glucosa y lipídico. Así mismo, se ha observado que el agonista sintético del BRS-3, [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, presenta efectos insulino-miméticos. Por ello, el sistema BRS-3/agonista representa una aproximación terapéutica potencial para obesidad y diabetes.

Considerando lo anterior, se realiza este trabajo centrado en el análisis del receptor BRS-3 y de los efectos de su agonista [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, en el tejido adiposo, muy relevante en la obesidad y la diabetes. Para llevar a cabo el estudio se han empleado piezas de tejido adiposo procedentes de modelos animales con alteraciones metabólicas, tales como insulino-resistencia, hiperlipidemia, diabetes tipo 1 y tipo 2, así como de pacientes obesos y diabéticos tipo 2. Adicionalmente, se han realizado observaciones a nivel celular sobre células aisladas de grasa epididimaria de rata y sobre adipocitos omentales maduros de línea celular humana, en ambos casos sin alteración en el metabolismo de la glucosa.

Los resultados mostraron expresiones reducidas del BRS-3, a nivel génico, en piezas de tejido adiposo de los modelos animales de hiperlipidemia y diabetes, tanto tipo 1 como tipo 2, al igual que en las muestras de pacientes obesos y diabéticos tipo 2. Sin embargo, no se han encontrado diferencias en el modelo animal de insulino-resistencia. A nivel proteico, tan sólo se han detectado disminuciones significativas del receptor en el tejido adiposo de las ratas diabéticas y de los pacientes tanto obesos como diabéticos. Analizando la secuencia del gen codificante para el receptor, no se ha encontrado mutaciones ni polimorfismos en el tejido adiposo de los pacientes con alteración en el metabolismo de la glucosa que pudiera explicar la reducción de expresión. A nivel celular, en ambas especies, el agonista sintético, al igual que la insulina, ha promovido la expresión tanto génica como proteica del BRS-3 y la elevación de los niveles de fosforilación de las quinasas PKB, p70s6K, MAPKs y p90 RSK-1. Además, el agonista ha inducido estimulación del transporte de glucosa y del proceso de lipogénesis, de manera dosis-dependiente, siendo máxima a concentraciones fisiológicas. Los efectos inducidos por el ligando sintético están mediados exclusivamente por el BRS-3.

En conjunto, estos resultados apoyan tanto al BRS-3 como a su agonista como potenciales herramientas terapéuticas para la obesidad y la diabetes.

SUMMARY

Obesity and diabetes *mellitus* are important health issues, with a high socio-economic impact, which prevalence continues increasing, not only in Europe and U.S.A. but also in populations all over the world. The treatments are limited; therefore, new effective molecular targets would be of relevant interest. Several studies in human involve the Bombesin Receptor Subtype 3 in both pathologies, and its deficit in mouse implies mild obesity and impaired glucose and lipid metabolism. Likewise, it has been observed that the synthetic agonist, [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesin₆₋₁₄, displays insulin-mimetic effects. For these reasons, the BRS-3/agonist system represents a potential therapeutic approach for obesity and diabetes.

Taking into account the previous data, this work is focused on the BRS-3 analysis, and the effects of its agonist [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesin₆₋₁₄ in the adipose tissue, which is very important in obese and diabetic states. In this study we examined adipose pieces from animal models with impaired metabolism, such as insulin-resistance, hyperlipidemia, type 1 diabetes, and also type 2 diabetes, as well as from obese and type 2 diabetic patients. Moreover, observations at cellular level are performed in isolated adipocytes from epididimal rat fat pads and in mature omental adipocytes from human cell line, in both cases without glucose metabolic alterations.

The results show a BRS-3 diminished gene expression, in adipose pieces of hyperlipidemic and type 1 and 2 diabetes animal model as well as in samples from obese and type 2 diabetic patients. Nevertheless, no differences were found in the insulin-resistant model. At protein level, only significant reductions of the receptor are detected in adipose tissue from diabetic rats and in obese or diabetic samples from patients. Neither mutations nor even polymorphisms in the BRS-3-gene was found in obese or type 2 diabetic patients by Sanger method of DNA sequencing, which could explain the reduced expression. At cellular level, in both species, the synthetic agonist as well as insulin, has promoted the BRS-3 expression, the increase in the phosphorylation levels of kinases PKB, p70s6K, MAPKs and p90 RSK-1. Furthermore, the agonist has induced stimulation of glucose transport and lipogenesis, in a dose-dependent manner, being maximal at physiologic concentrations. The elicited effects by the synthetic ligand are exclusively mediated by the BRS-3.

Overall these results support the concept that BRS-3 receptor and also its agonist, as potential therapeutic tools for obesity and diabetes.

ÍNDICE

Agradecimientos	4
Resumen	5
Summary	6
Índice	7
1. Clave de abreviaturas	10
2. Introducción	14
3. Objetivos	35
4. Material y métodos	37
4.1 Muestras del estudio	37
4.1.1 Muestras de rata	37
4.1.1.a Tejido adiposo epididimario de rata	37
4.1.1.a (i) Grupo de ratas control	38
4.1.1.a (ii) Inducción de resistencia a la insulina en ratas	38
4.1.1.a (iii) Inducción de hiperlipidemia en ratas	39
4.1.1.a (iv) Inducción de diabetes tipo 2 en ratas	39
4.1.1.a (v) Inducción de diabetes tipo 1 en ratas	40
4.1.1.a (vi) Obtención de muestras de tejido adiposo animal	40
4.1.1.b Adipocitos epididimarios de rata	40
4.1.2 Muestras de humano	42
4.1.2.a Tejido adiposo visceral	42
4.1.2.b Adipocitos diferenciados de línea celular de humano	43
4.2 Reactivos e inhibidores	44
4.3 Expresión génica	45
4.3.1 Estimulación celular	46
4.3.1.a En adipocitos epididimarios de rata	46
4.3.1.b En adipocitos diferenciados de línea celular de humano	47
4.3.2 Aislamiento de ARN mensajero	47
4.3.2.a Preparación de la muestra	48
4.3.2.a (i) En adipocitos epididimarios de rata	48
4.3.2.a (ii) En piezas de tejido adiposo de rata y de humano	48
4.3.2.a (iii) En adipocitos diferenciados de línea celular de humano	48
4.3.2.b Separación y aislamiento del ARNm	48
4.3.3 Síntesis de ADN complementario	49
4.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real	50
4.3.5 Cálculos de la expresión génica	51

4.4	Secuenciación génica.....	51
4.4.1	Aislamiento y medición de ADN genómico.....	51
4.4.2	Reacción de amplificación.....	52
4.4.3	Electroforesis horizontal.....	55
4.4.4	Purificación de los productos de PCR.....	55
4.4.5	Reacción de secuenciación.....	56
4.4.6	Secuenciación capilar tipo Sanger y análisis de secuencias.....	56
4.5	Microscopía confocal.....	57
4.5.1	En adipocitos epididimarios de rata.....	57
4.6	Expresión proteica.....	58
4.6.1	Estimulación celular.....	58
4.6.1.a	En adipocitos epididimarios de rata.....	59
4.6.1.b	En adipocitos diferenciados de línea celular de humano.....	59
4.6.2	Solubilización de proteínas.....	59
4.6.2.a	Solubilización de proteínas totales.....	61
4.6.2.a (i)	En tejido adiposo.....	61
4.6.2.a (ii)	En adipocitos epididimarios de rata.....	61
4.6.2.a (iii)	En adipocitos diferenciados de línea celular de humano.....	61
4.6.2.b	Solubilización de proteínas de membrana.....	61
4.6.2.b (i)	En adipocitos aislados epididimarios de rata.....	62
4.6.3	Medición de proteína.....	62
4.6.4	Electroforesis vertical.....	62
4.6.5	Transferencia.....	63
4.6.6	Inmunodetección de las proteínas.....	64
4.6.7	Cuantificación de proteína.....	66
4.7	Transporte de glucosa.....	67
4.7.1	Transporte de glucosa en adipocitos epididimarios de rata.....	68
4.7.2	Transporte de glucosa en adipocitos diferenciados de línea celular de humano.....	69
4.8	Lipogénesis.....	69
4.8.1	Lipogénesis en adipocitos epididimarios de rata.....	70
4.8.2	Lipogénesis en adipocitos diferenciados de línea celular de humano.....	70
4.9	Análisis estadístico de los resultados.....	71
5.	Resultados.....	73
5.1	Expresión del receptor BRS-3 en el tejido adiposo de modelos animales y humanos con alteraciones metabólicas.....	73
5.2	Secuenciación del gen para el receptor BRS-3 en el tejido adiposo de pacientes con alteraciones metabólicas.....	76

5.3	Efectos del [D-Tyr ⁶ ,β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄ en la expresión del receptor BRS-3 en los adipocitos de rata y humano.	77
5.4	Efecto del [D-Tyr ⁶ ,β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄ en la activación de las enzimas de señalización intracelular.....	77
5.4.1	Fosforilación de las enzimas en los adipocitos aislados de rata.	80
5.4.1.a	PKB.....	80
5.4.1.b	p70s6K.....	80
5.4.1.c	p42/44 MAPKs.....	80
5.4.1.d	p90 RSK-1.....	83
5.4.2	Fosforilación de las enzimas en los adipocitos diferenciados de línea celular de humano.	83
5.4.2.a	PKB.....	83
5.4.2.b	p70s6K.....	83
5.4.2.c	p42/44 MAPKs.....	83
5.4.2.d	p90 RSK-1.....	86
5.5	Efecto del [D-Tyr ⁶ ,β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄ sobre el Glut-4 y el transporte de glucosa.....	86
5.5.1	Efecto del [D-Tyr ⁶ ,β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄ sobre la expresión del Glut-4 y su localización en la membrana plasmática.	86
5.5.2	Efecto del [D-Tyr ⁶ ,β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄ sobre el transporte de glucosa.	87
5.6	Efecto del [D-Tyr ⁶ ,β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄ en el metabolismo de lípidos: lipogénesis.	93
5.7	Especificidad del ligando del receptor BRS-3.	95
6.	Discusión	103
7.	Conclusiones	110
8.	Bibliografía	113

1. CLAVE DE ABREVIATURAS

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleicocomplementario
ADR	gen del receptor adrenérgico
AMPc	adenosín monofosfato cíclico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
BE	medio basal sin glucosa
Bn	bombesina
BPD-DS	derivación biliopancreática con cruce duodenal
BRS-3	Receptor de la Bombesina Subtipo 3
<i>BRS3</i>	gen codificante para BRS-3
BSA	albúmina de suero bovino
BYGB	bypass gástrico Roux-en-Y
CC	circunferencia de cintura
CRE	elemento en respuesta a cAMP
CREB	elemento de unión en respuesta a cAMP
DAG	diacil glicerol
DEPC	dietilpirocarbonato
DPP-4	enzima dipeptidil peptidasa 4
DT2	diabetes tipo 2/ diabético tipo 2
DT1	diabetes tipo 1/ diabético tipo 1
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EEM	error estándar de la media
EMA	Agencia Europea del Medicamento
FBS	suero fetal bovino
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos
FTO	proteína asociada a masa adiposa y obesidad
GAPDH	gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa
GIP	péptido insulínico dependiente de glucosa
GLP-1	péptido similar al glucagón tipo 1

Glut-4	glucotransportador tipo 4
GPCR	receptor acoplado a proteína G
GRP	péptido liberador de gastrina
GRPR	receptor del péptido liberador de gastrina
HL	hiperlipidémica
HOMA	modelo de evaluación de la homeostasis
HRP	peroxidasa de rábano picante
ICA	índice cintura-altura
ICC	índice cintura-cadera
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IMC	índice de masa corporal
IL	interleuquina
IP3	inositol 3-fosfato
IR	insulino-resistencia/ insulino-resistente
IRS-1	substrato 1 del receptor de insulina
KO	knockout
KRB	tampón Krebs-Ringer
LAGB	banda gástrica ajustable laparoscópica
LSG	gastrectomía vertical en manga
MAPK	proteína kinasa activadas por mitógenos
MCP-1	proteína 1 quimiotáctica de monocitos
MS	medio de solubilización
mTOR	diana en los mamíferos de la rapamicina
N	rata normal
NMB	neuromedina B
NMBR	receptor neuromedina B
OB	obesidad
OM-AM	medio de adipocitos omentales
OM-BM	medio basal omental
OM-DM	medio de diferenciación de adipocitos omentales
OM-PM	medio de preadipocitos omentales
OMS	Organización Mundial de la Salud

p70s6K	proteína ribosómica s6 quinasa
PBS	phosphate-buffered saline (búfer fosfato salino)
PI3K	fosfatidil inositol 3 quinasa
PKA	proteína quinasa A
PKB	proteína quinasa B
PKC	proteína quinasa C
PKD	proteína quinasa D
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PCR-RT	reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
PLC	fosfolipasa C
PLIN	gen de la perilipina
PPAR	receptor activado por proliferador de peroxisomas
PPAR	receptor activado por proliferador de peroxisomas
PYY	péptido YY
RBP4	proteína tipo 4 de unión al retinol
SGLT-2	cotransportador sodio-glucosa tipo 2
SN	sujeto normal
SNP	polimorfismo de nucleótido único
STZ	estreptozotocina
TAB	tejido adiposo blanco
TAM	tejido adiposo marrón
TBS	búfer fosfato salino
TNF- α	factor de necrosis tumoral α
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
UTR	región de ADN no traducida

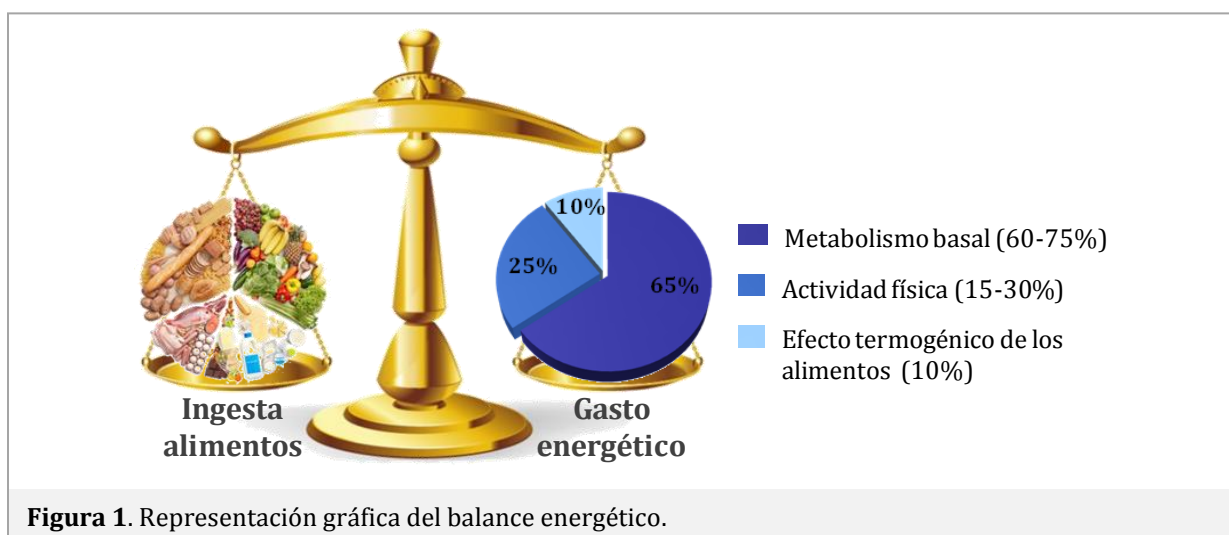


INTRODUCCIÓN

2. INTRODUCCIÓN

La energía, término procedente del griego *ἐνέργεια* —*enérgeia*— que significa actividad, operación, es la capacidad de la materia para producir trabajo.

Particularizando en los sistemas biológicos, los organismos vivos logran su supervivencia mediante la transformación de agua y nutrientes —proteínas, carbohidratos, grasas, vitaminas y minerales— en trabajo. Ésto les permite cubrir la demanda energética generada tanto por las actividades físicas, como por la tasa metabólica basal del propio organismo, destinada al mantenimiento del pulso cardíaco, de la respiración, la regulación de la temperatura corporal y la conservación de la homeostasis en general [1–3]. La existencia de un equilibrio entre la energía que recibe y gasta el sistema, es básica para el buen funcionamiento del mismo (Figura 1).



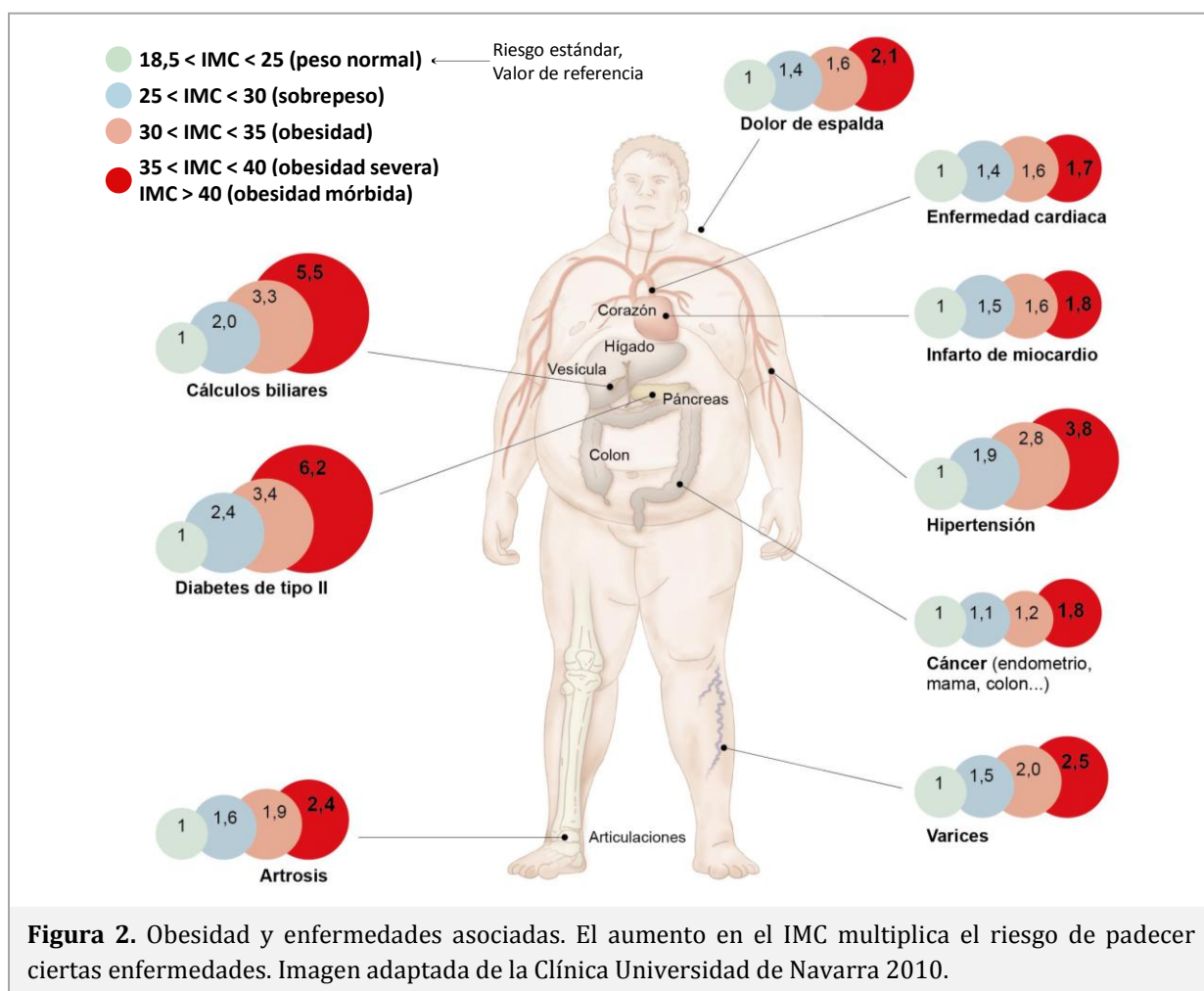
Cuando el conjunto se desequilibra a favor del gasto energético, se produce el consumo de las reservas de nutrientes, situación que de manera prolongada puede ser causa y/o derivar en diversos estados patológicos tales como anemia, desnutrición o trastorno psiquiátrico [4]. Por el contrario, si el desequilibrio es causado por una ingesta de alimentos superior al gasto energético, se genera un exceso de energía, que el organismo almacena, eficientemente, en forma de lípidos en el tejido adiposo, reservorio de energía por excelencia en los mamíferos [5].

La evolución y desarrollo del ser humano han inducido modificaciones en su entorno y estilo de vida, dando lugar a un ambiente obesogénico [6]. Éste se caracteriza por la optimización de energía mediante la automatización de procesos cotidianos, la vida sedentaria y la ingesta de productos principalmente procesados —con elevado contenido en grasas y azúcares—, descompensando el balance energético a favor de un exceso de nutrientes [7,8].

La acumulación elevada de grasa o adiposidad está asociada a eventos negativos en la

salud del individuo [9,10]. Cuando ésta es extrema, se denomina obesidad; condición catalogada como enfermedad en 1948, por la Organización Mundial de la Salud (OMS), y tras el rápido crecimiento de su prevalencia, en 1997, como epidemia [11–13]. Actualmente 1.900 millones de la población mundial adulta presentan sobrepeso, de los cuales más de 600 millones son obesos y 41 millones de menores de 5 años tienen sobrepeso u obesidad. Las estimaciones para 2030, proyectan que más de la mitad de la población del planeta se caracterizará por un exceso de grasa [14–16].

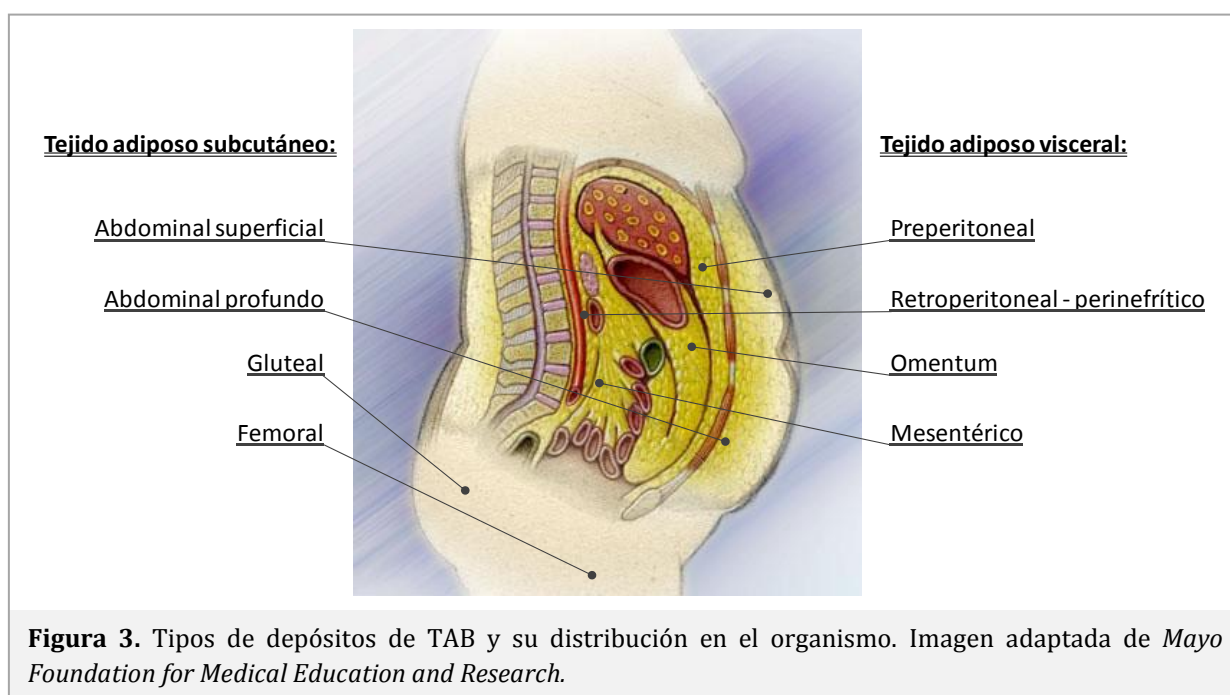
Para evaluar el nivel de adiposidad de un individuo, en la práctica clínica se emplea el índice de masa corporal o IMC, valor resultante de dividir el peso corporal en kilogramos entre el cuadrado de la estatura en metros [17]. En función del IMC, la OMS clasifica a los individuos como: infrapeso ($\text{IMC} < 18,5 \text{ kg/m}^2$), normopeso, con sobrepeso, obesos, con obesidad severa u obesos mórbidos (Figura 2). Existe una relación entre el IMC y el riesgo de padecer ciertas enfermedades, así como con la mortalidad. Los valores de IMC inferiores al normopeso están vinculados con trastornos psiquiátricos (depresión, anorexia y bulimia) y enfermedades oncológicas o estadios finales de éstas [18,19]. Por otro lado, en valores superiores a 25 kg/m^2 , el riesgo se asocia a artrosis, dolor de espalda, hipertensión, dislipidemia, enfermedad cardiovascular, varices, cálculos



biliares, diversos tipos de cáncer y alteraciones en el metabolismo de la glucosa, como la diabetes tipo 2 (DT2) [9,10]. A pesar de que el empleo de este índice está ampliamente aceptado, se trata de un valor limitado puesto que no considera el género, raza, ni la edad de los individuos, ni otras características antropométricas: el porcentaje de grasa, la distribución del tejido adiposo, los estados nutricional, físico y metabólico, u otros factores que afectan al estado de salud y al riesgo de mortalidad del sujeto [20].

En el humano la presencia del tejido adiposo es altamente variable, pudiendo representar desde el 5 hasta el 60 % del peso total [21]. Se describen dos tipos de tejido graso: el tejido adiposo marrón (TAM) —puntual y escasamente localizado en las regiones cervical-supraclavicular, perirrenal y paravertebral, pero con un papel crítico en la termogénesis inducida por el frío, principalmente en los neonatos y con potencial terapéutico en la obesidad [22]— y el tejido adiposo blanco (TAB) —el cual es el mayoritario y almacena específicamente la energía sobrante en forma de triacilglicéridos, para su posterior liberación como ácidos grasos libres y glicerol, bajo el control del sistema nervioso y endocrino [21,23]—.

La distribución del TAB en el humano es muy heterogénea, ya que el tejido está conformado por varios depósitos anatómicos [21]. Principalmente se pueden diferenciar el tejido adiposo subcutáneo, localizado fundamentalmente en la zona abdominal, gluteal y femoral; y el tejido adiposo visceral, el cual se encuentra recubriendo diferentes órganos en la cavidad peritoneal, incluyendo los depósitos grasos perinefrítico, mesentérico y omental (Figura 3). Además, existen numerosos depósitos de tamaño inferior, tales como el epicárdico e intermuscular, que pueden servir para funciones especializadas relacionadas con sus tejidos adyacentes [24,25].



La topografía corporal está determinada por los diferentes tipos de cúmulos de grasa, lo cual genera consecuencias patofisiológicas muy diversas, además de constituir un factor clave en las enfermedades metabólicas [26]. La obesidad androide, conocida también como central, se vincula con alteraciones en el metabolismo de la glucosa y enfermedad coronaria. Sin embargo, la obesidad ginoide o periférica está relacionada con menores riesgos e incluso puede llegar a ejercer una acción protectora, puesto que se correlaciona negativamente con los factores de riesgo, como valores HOMA (modelo de evaluación de la homeostasis) y niveles de glucosa y lípidos [27–32].

La incorporación a la clínica de parámetros simples (Figura 4), como la circunferencia de cintura (CC), el índice cadera-cintura (ICC) o el índice cintura-altura (ICA), se han revelado muy útiles ya que proporcionan evidencias de que la distribución de la grasa es un predictor de las anormalidades metabólicas y el riesgo cardiovascular [33–35].

CC			ICC			ICA			
[cintura (cm)]			[cintura / cadera]			[circunferencia cintura / altura]			
Hombres	Mujeres	Riesgo enfermedad	Hombres	Mujeres	Riesgo cardiovascular	Niños (hasta <15 años)	Hombre	Mujer	Categoría
> 94	> 80	Alto	< 0,85	< 0,75	Excelente	< 0,34	< 0,34	< 0,34	Extremadamente delgado
> 102	> 88	Muy Alto	0,85 - 0,90	0,75 - 0,80	Bueno	0,35 - 0,45	0,35 - 0,42	0,35 - 0,41	Delgado sano
			0,90 - 0,95	0,80 - 0,85	Promedio	0,46 - 0,51	0,43 - 0,52	0,42 - 0,48	Sano
			0,95 - 1,0	0,85 - 0,90	Alto	0,52 - 0,63	0,53 - 0,57	0,49 - 0,53	Sobrepeso
			> 1,0	> 0,90	Extremo	> 0,64	0,58 - 0,62	0,54 - 0,57	Sobrepeso elevado
							> 0,63	> 0,58	Obesidad mórbida

Figura 4. Clasificación del estado de salud de los individuos en función de los parámetros de circunferencia de cintura (CC), índice cintura-cadera (ICC) e índice cintura-altura (ICA). Tabla generada con los datos obtenidos de [33,35].

La ventaja de estos índices es que permiten una estimación aproximada de la cantidad relativa de tejido adiposo visceral, por lo que una reducción en la línea de la cintura con la pérdida de peso, es un signo de que la grasa abdominal disminuye [36,37]. Sin embargo, la variación en la cintura no puede distinguir el llamado tejido adiposo visceral del tejido abdominal localizado subcutáneamente, por lo que se hace necesario la aplicación de técnicas de imagen como la tomografía computarizada o la resonancia magnética [38,39]. Este hecho es muy relevante ya que una acumulación preferencial de grasa visceral se asocia a una amplia gama de comorbilidades: apnea del sueño, aumentos en el riesgo de desarrollar cáncer de colon, cáncer de próstata y esofágico, hipertensión, dislipidemia aterogénica, enfermedades cardiovasculares, alteraciones en la homeostasis de la glucosa en plasma, insulino-resistencia y DT2 [40–50]; mientras que el almacenamiento de lípidos en forma de grasa subcutánea correlaciona en menor medida con anormalidades metabólicas [28,51].

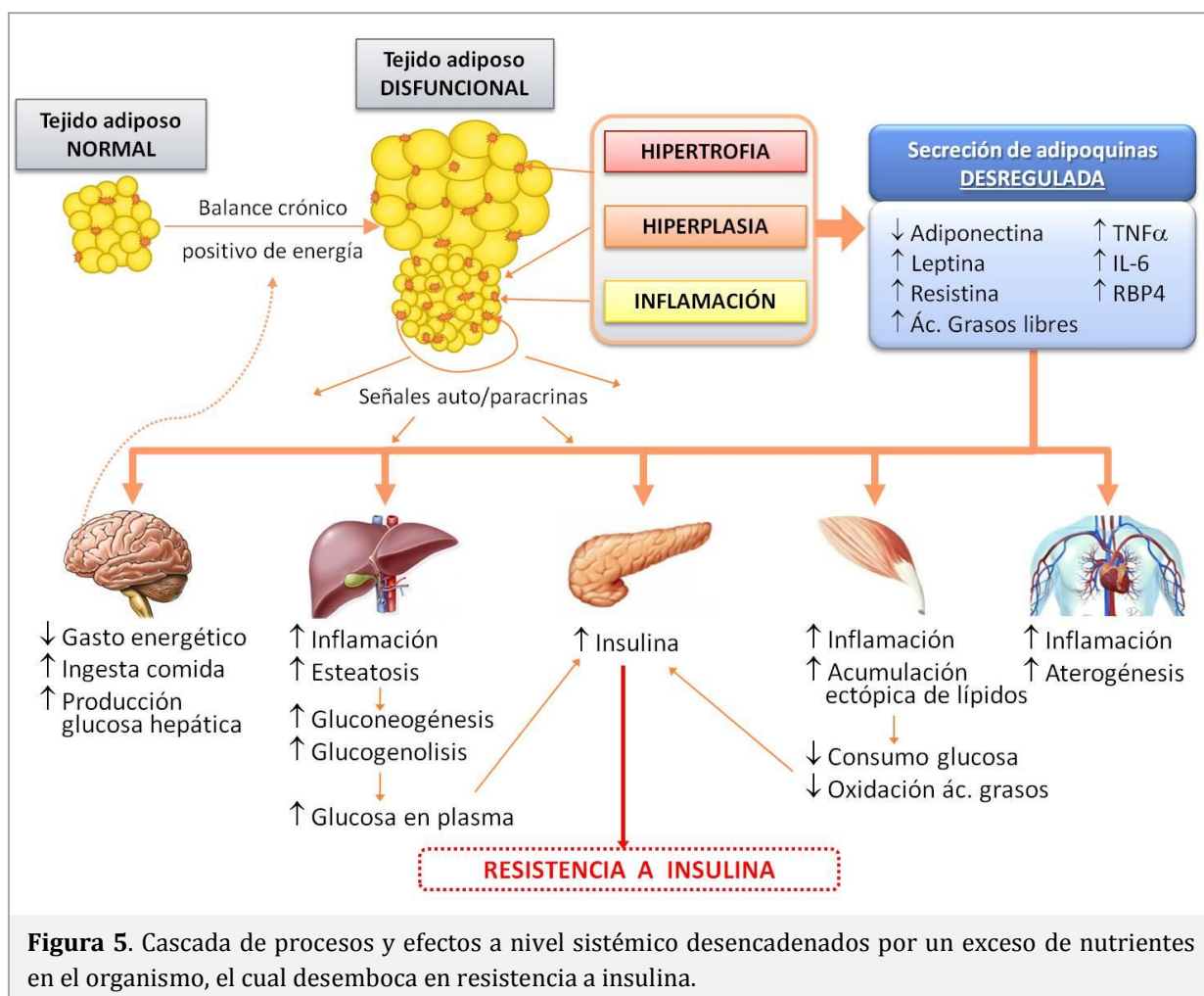
El TAB está compuesto por adipocitos blancos, preadipocitos —células madre multipotentes con pérdida de capacidad de diferenciación en otros linajes mesenquimales—, células endoteliales, pericitos, así como diversas células del sistema inmune (macrófagos, linfocitos B y T, células NK, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas y mastocitos) [21,52]. Además, en el TAB se pueden encontrar adipocitos beis, denominados así puesto que proceden de células mesenquimales del TAB o son adipocitos blancos transdiferenciados a marrones, proceso causado por una activación noradrenérgica o por termogénesis [53].

El TAB además de constituir una reserva energética, desarrolla funciones de órgano endocrino, puesto que mediante la secreción de factores endocrinos y paracrinicos, denominados adipoquinas, ejerce una acción determinante en la regulación del metabolismo y la homeostasis corporal [54,55]. Los adipocitos producen diferentes hormonas, siendo las principales la leptina, cuya función es reducir el apetito y aumentar el gasto energético, y la adiponectina, la cual activa el metabolismo de la glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina —hormona originada a partir de un precursor (proinsulina) en las células β de los islotes de Langerhans que activa una señal en los tejidos correspondientes, para que la glucosa sea retirada de la circulación y convertida en producto de almacenamiento (glucógeno y triacilglicéridos)— [56,57]. Estas células, también liberan la proteína tipo 4 de unión al retinol (RBP4), que disminuye la señalización de la insulina en el músculo esquelético, y la resistina, con actividad quimioatrayente, aunque en humanos se expresa en niveles muy bajos [58]. Por otro lado, las células inmunes infiltradas en el TAB, secretan citoquinas pro-inflamatorias, como son las interleuquinas IL-6, IL-8, IL-10, la proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), este último también puede ser producido por los adipocitos [55]. Específicamente la IL-6, además de inhibir la señalización de la insulina, favorece la liberación de ácidos grasos. Por lo general, en el tejido adiposo subcutáneo la secreción de las adipoquinas leptina y adiponectina es mayor que en el visceral. Por el contrario, las citoquinas proinflamatorias presentan mayor expresión en el visceral que en el subcutáneo, al igual que la resistina [21,55].

En un estado sin alteraciones metabólicas, un excedente de nutrientes induce en los adipocitos hipertrofia —crecimiento del tamaño celular—, equilibrada por la hiperplasia en los preadipocitos —aumento del número de células— con el fin de regular la homeostasis del tejido adiposo y aumentar la capacidad de almacenaje. Sin embargo, en estados diabéticos se observa un aumento de hipertrofia en los adipocitos debido a una disminución de la fibrosis del tejido adiposo y menor disponibilidad de preadipocitos que limita la generación de nuevas células adiposas [59].

La expansión del tejido adiposo conlleva una mayor infiltración de macrófagos e inflamación, que promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias y causa una desregulación del secretoma del tejido [60]. Específicamente, disminuye la liberación de

adiponectina, mientras que aumenta la de resistina, RBP4 y leptina (Figura 5). Los altos niveles de leptina que se encuentran en sujetos obesos, sugieren la existencia de un mecanismo de resistencia [55].



Además, todo ello se acompaña de un aumento, por parte de los adipocitos, en la liberación de ácidos grasos al torrente sanguíneo, elevando en el páncreas la secreción de insulina y disminuyendo su sensibilidad en el hígado y el músculo [60]. En conjunto se genera un estrés oxidativo y una leve inflamación crónica, tanto a nivel autocrino como paracrino, desencadenando la disminución de la sensibilidad a la insulina [21]. Una reducción de respuesta a la insulina conduce a la elevación de los niveles de glucosa en plasma, que a nivel sistémico implica un aumento de los niveles de los ácidos grasos en el hígado y una disminución de la oxidación de los mismos en el músculo y del consumo de glucosa [55]. Además, a través del hipotálamo se envían señales que reducen el gasto energético y aumentan la ingesta de alimentos. El sistema deriva a un estado de hiperinsulinemia, que sostenido en el tiempo, desemboca en una resistencia sistémica a la insulina, denominado estadio prediabético y que puede culminar en DT2, la enfermedad metabólica más frecuente [60–62].

La diabetes *mellitus* es una condición crónica que se debe a la producción insuficiente o insensibilidad del organismo a la insulina y se diagnostica mediante la detección de elevados niveles de glucosa en sangre —glucemia en ayunas ≥ 126 mg/dl y/o ≥ 200 mg/dl de glucosa en sangre a las 2 horas tras una carga oral de 75 g de glucosa— [63,64]. La hiperglucemia crónica de la diabetes se asocia a la disfunción e insuficiencia de multitud de tejidos y distintos órganos —ojos, riñones, nervios, y sistema vascular—, causando, por ejemplo, retinopatía o nefropatía diabética [63].

Principalmente se describen cuatro tipos de diabetes.

- La tipo 1, que resulta de una destrucción autoinmune de las células β del páncreas y representa el 7-12 % de la población diabética [65].
- La tipo 2, la cual se caracteriza por resistencia y relativa deficiencia de insulina, lo que representa entre el ≈ 90 % de todos los casos de diabetes. Como ya ha sido señalado anteriormente la adiposidad visceral es un factor clave en su desarrollo; de hecho, en 1973, Ethan Sims, acuñó el término *diabesidad* para describir el vínculo existente entre ambas patologías: un 60 % de los diabéticos tipo 2 presentan un IMC superior a 30 kg/m² [65–67].
- La diabetes gestacional se define por la presencia de niveles elevados de glucosa en la sangre durante el embarazo —uno de cada siete embarazos— y se asocia con complicaciones para la madre y el feto [65].
- La diabetes MODY está causada por la existencia de defectos genéticos en las células β , así como mutaciones en el receptor de insulina, las cuales generan alteraciones en la acción de la hormona [63,65].

Los datos epidemiológicos globales de la Federación Internacional de Diabetes (IDF) muestran 415 millones de diabéticos en la población mundial y estiman que en el año 2040 esta cifra se elevará a 642 millones; incluyendo 542.000 niños diabéticos, cifra que aumenta un 3 % cada año [65,68,69]. La diabetes es una enfermedad que en 2015 causó 5 millones de muertes, de las cuales aproximadamente la mitad (47 %) eran personas de edad inferior a 70 años [65].

Por todo lo anterior, el desarrollo de estrategias terapéuticas en el campo de la obesidad y la diabetes es fundamental para ofrecer tratamientos eficaces.

La modificación del estilo vida —mejoras nutricionales y actividad física— es la primera intervención y la más recomendada para los pacientes con sobrepeso y obesidad. La pérdida de peso inducida por una dieta baja en calorías —reducción entre un 15-40 % en las calorías de la ingesta diaria— y/o ejercicio aeróbico, origina una reducción del IMC y de la grasa visceral [70–72]. A parte de estos cambios, se han descrito modificaciones en el secretoma, cuyos niveles

desregulados en la obesidad, tienden a recuperar la normalidad [73]. Una reducción de grasa visceral superior al 10 % se acompaña de un aumento en los niveles de adiponectina y de una disminución de los de leptina; además, se han descrito descensos en los niveles de triglicéridos y colesterol circulantes [73,74]. El efecto de la dieta en los valores de resistina, RBP-4 y citoquinas proinflamatorias (IL-6, 8, RBP-4 y MCP-1), al igual que se ha comprobado con la actividad física, no son concluyentes [73–76]. Sin embargo, el ejercicio aeróbico ha demostrado mejorar parámetros bioquímicos en los sujetos obesos, disminuyendo los niveles de insulina, leptina y triglicéridos en plasma. Cuando se combina con una restricción calórica, además, mejora la glucemia [75–78].

No obstante, la efectividad generada por estas intervenciones puede estar influenciada por la variabilidad genética del individuo. Se ha descrito que en sujetos obesos portadores del polimorfismo PLIN 11482G>A, una restricción calórica, aplicada durante un año, no conduce a pérdida de peso, mientras que sujetos de genotipo GG muestran una reducción del 8 % [79]. Análogamente, el ejercicio físico en portadores de los alelos de los receptores adrenérgicos (ADR) Arg64 β 3-ADR, Glu27 β 2-ADR, Glu⁹ α 2b-ADR, induce una mayor respuesta en la pérdida de grasa corporal [80].

En los pacientes que cumplan los criterios de elegibilidad —IMC ≥ 40 kg/m² o ≥ 35 kg/m² y comorbilidades asociadas, tales como la DT2 y la hipertensión arterial—, además de la intervención en el estilo de vida se puede llevar a cabo cirugía bariátrica [81]. En la actualidad se realizan principalmente cuatro técnicas, caracterizadas por ser restrictivas y/o malabsortivas: banda gástrica ajustable laparoscópica (LAGB), gastrectomía vertical en manga (LSG), derivación biliopancreática con cruce duodenal (DBP-DS) y bypass gástrico Roux-en-Y (BYGB)— [82]. La pérdida de peso resultante de este tratamiento quirúrgico corresponde a una significativa disminución de la grasa, tanto visceral como subcutánea, así como de una mejora de los parámetros metabólicos. Los más relevantes son el incremento de la adiponectina y reducción de la leptina circulantes, así como otros factores: insulina, glucemia en ayunas, colesterol total y triglicéridos [83,84]. También mejora el índice de resistencia a la insulina (HOMA-IR) y eleva los niveles de colesterol HDL [85]. Conjuntamente, se ha comprobado que la cirugía bariátrica, no sólo cambia la composición de la microbiota intestinal, relacionada con la obesidad ya que promueve la captación de grasas procedentes de la dieta y sus metabolitos regulan el metabolismo lipídico el equilibrio energético, sino que la enriquece, asemejándose más a aquella que muestran sujetos normopeso [86]. Los mecanismos de reducción de peso tras la cirugía bariátrica son fundamentalmente fisiológicos: se modifican los niveles de hormonas gástricas, la señalización neuronal y el metabolismo, tanto de lípidos como de glucosa. Además, son también de tipo mecánico, ya que las técnicas quirúrgicas restringen la cantidad de la ingesta al igual que impiden la absorción de los nutrientes [84,87,88].

Se ha descrito que el péptido similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), el péptido YY (PYY) y la oxintomodulina, secretadas por las células L intestinales, incrementan sus niveles tras aquellas operaciones bariátricas que implican una reorganización del intestino y un acortamiento del paso de los nutrientes a la zona distal de éste. Los aumentos en estas hormonas de potente acción anorexígena, pueden contribuir significativamente a la pérdida de peso. En cambio, el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP) y la grelina, muestran descensos tras las cirugías bariátricas en las que se elimina la región del fundus, donde se localizan las células productoras de ambas hormonas. Específicamente, el PYY y la grelina tienen capacidad para traspasar la barrera hematoencefálica y actuar en el sistema nervioso central, en concreto en el núcleo arqueado del hipotálamo), a diferencia del GLP-1 que es sintetizado por neuronas del hipotálamo y núcleo caudal del tracto solitario [87–89]. A excepción de la grelina, el resto de hormonas son degradadas por la enzima dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4), cuyos niveles disminuyen tras la intervención bariátrica [84,87,88].

Los resultados derivados de la cirugía bariátrica también se encuentran influenciados por el perfil genético de los individuos. Por ejemplo, se ha observado que pacientes con obesidad mórbida portadores del alelo TT en el SNP (polimorfismo de nucleótido único) rs4846567, localizado en la proximidad del gen LYPLAL1, muestran menor sensación de apetito antes de la cirugía y una mayor reducción de IMC tras someterse a un BYGB [90]. Así como obesos homocigotos T en el polimorfismo rs9939609 del gen FTO, muestran una mayor reducción del peso en los primeros tres meses tras una BPD-DS [91].

En comparación con la intervención en el estilo de vida, la cirugía bariátrica es la terapia más efectiva en pérdida de peso, ya que de promedio los pacientes reducen 12 puntos de IMC, mientras que con dieta o ejercicio aeróbico sólo se reduce el índice en un rango de 1 a 4 puntos, [92]; además, los pacientes muestran una significativa mejora psicosocial durante el primer año [93]. Sin embargo, a pesar de los beneficios, se ha descrito un aumento del uso de los servicios sanitarios, del abuso de sustancias, episodios de depresión y autolesión y de trastornos psiquiátricos en los pacientes sometidos a cirugía, postulándose como posible consecuencia de la alteración en la señalización neuronal que genera tal intervención [94–96].

Como última aproximación terapéutica a mencionar, se encuentra la farmacológica. En la actualidad, la lista de los tratamientos eficientes autorizados, al menos en un país, se reduce a nueve medicamentos (Tabla 1). Ésto es debido, por un lado, al limitado conocimiento de los mecanismos patológicos asociados a la obesidad, y por otro, a la interferencia de estos compuestos con los procesos complejos bioquímicos que controlan la alimentación, llegando a desencadenar importantes efectos adversos como cardiotoxicidad o inducción al abuso de fármacos [97]. En España, actualmente hay tres fármacos aprobados como tratamiento para la obesidad: Orlistat,

Naltrexona/Bupropión y Liraglutida, estos dos últimos de reciente aprobación (www.aemps.gob.es). El Orlistat funciona como inhibidor de lipasas, tanto gástricas como pancreáticas, en el tracto gastrointestinal. El fármaco impide la hidrólisis de los triglicéridos provenientes de la dieta, por lo que son excretados sin digerirse. Con la prescripción estándar de 120 mg tres veces al día, el compuesto evita la absorción de un 30 % de las grasas [98]. El Orlistat, como el resto de fármacos antiobésicos se administra vía oral; la excepción es la Liraglutida, cuya vía de administración es subcutánea. Antes de ser aprobada, a finales del 2016, como tratamiento para la obesidad, su uso estaba limitado como antidiabético.

Nombre comercial	Principio activo	Mecanismo de acción	Año aprobado
Adipex-P, Ionamin	Fentermina	Mecanismo exacto desconocido: Agente liberador de norepinefrina-dopamina.	1959
Alli, Xenical	Orlistat	Mecanismo exacto desconocido: Inhibe lipasas gástricas y pancreáticas.	1999
Belviq	Lorcaserina	Mecanismo exacto desconocido: Agonista selectivo del receptor 5-HT _{2C} .	2012
Contrave, Mysimba	Naltrexona + Bupropión	Mecanismo exacto de ambas drogas desconocido: - Bupropión: Agente inhibidor de la recaptación y liberación de norepinefrina y agonista del receptor nicotínico de acetilcolina. - Naltrexona: Aumenta la activación por bupropión de la proopiomelanocortina (POMC).	2014
Didrex	Benzfetamina	Mecanismo exacto desconocido: Agente liberador de norepinefrina-dopamina.	1960
Obezine	Fendimetracina	Mecanismo exacto desconocido: Agente liberador de norepinefrina-dopamina.	1961
Qsymia, Qnexa	Fentermina + Topiramato	Phentermina: Agente liberador de norepinefrina-dopamina. Topiramato: aumenta el gamma-aminobutirato (GABA), inhibe a los receptores de ácido a-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionico (AMPA) y kainato glutamato, e inhibe la anhidrasa carbónica.	2012
Saxenda, Victoza	Liraglutida	Agonista del receptor del péptido tipo 1 similar al glucagón (GLP-1)	2014
Tenuate Dospan	Dietilpropión	Mecanismo exacto desconocido: Agente liberador de norepinefrina-dopamina.	1959

Tabla 1. Listado de fármacos antiobésicos actualmente aprobados para su uso, al menos en un país. (Tabla traducida de [97]).

En lo que se refiere al tratamiento de la DT2, con frecuencia, el primer abordaje es el control de la ingesta calórica y el aumento de la actividad física, a fin de modular los niveles de glucosa en sangre. Al igual que lo mencionado en la obesidad, la modificación del estilo de vida genera mejoras sobre el nivel glucémico, la reducción del IMC y la sensibilidad a la insulina [99]. Además, se ha comprobado que la mejora metabólica que resulta tras la cirugía bariátrica, apunta su utilización como terapia para la DT2 en individuos con obesidad [82,100]. Específicamente, la intervención BPD-DS, realizada en sujetos obesos con DT2, generó la remisión de la diabetes en el 90 % de los pacientes tras 12 meses. El 10 % restante de los pacientes se mantuvieron en tratamiento con metformina y sulfonilurea, antidiabéticos orales [83].

Existen otras opciones farmacológicas para el control glucémico en DT2 (Tabla 2), aprobadas por la *Food & Drug Administration* (FDA) y la *European Medicines Agency* (EMA). Estos tratamientos están enfocados a aumentar la secreción de insulina, elevar su sensibilidad y disminuir la glucemia.

Clase	Mecanismo de acción	Peso	Hipoglucemia	Principio activo	Nombre comercial
Sulfonilureas	Cierran los canales de K^+ de las células β . ↑ secreción de insulina	ganancia	moderada/	Cloropropamida	Diabinese, Glucamide
				Glipizida	Glucocontrol,
				Gliburida	Micronase, Diabeta
				Glimepirida	Amaryl, Roname
				Gliclacida	Diamicron, Teva
				Glibendámidica	Daonil, Glucolon
Meglitinidas	Cierran los canales de K^+ de las células β . ↑ secreción de insulina	ganancia	media	Gliquidona	Glurenor
				Repaglinida	Prandin, Novonorm
				Nateglinida	Starlix
Biguanidas	Activan de la AMP-ciclasa. ↑ sensibilidad a insulina ↓ producción glucosa hepática ↓ absorción glucosa intestinal	leve pérdida	neutral	Metformina	Fortamet, Glucophage Glumetza Riomet
Tiazolidinedionas	Activan de PPAR- γ . ↑ sensibilidad a insulina	ganancia	neutral	Pioglitazona Rositagliazona	Actos, Glustin Avandia, Avandamet
Agonistas de dopamina-2	Activan de receptores dopaminérgicos y modulan regulación hipotalámica del metabolismo. ↑ sensibilidad a insulina	neutro	neutral	Bromocriptina	Parlodel, Cycloset
Agonistas del receptor GLP-1	Activan de los receptores GLP-1 de las células β . ↑ secreción de insulina ↓ secreción de glucagón	leve pérdida	neutral	Exenatida	Byetta, Bydureon
				Liraglutida	Victoza, Saxenda
				Lixisenatida	Lyxumia, Adlyxin
				Albiglutida	Tanzeum, Eperzan
				Dulaglutida	Trulicity
Inhibidores de DPP-4	Inhiben actividad de DDP-4 y aumentan la vida de incretinas. ↑ secreción de insulina ↓ secreción de glucagón	neutro	neutral	Sitagliptina	Januvia, Tesavel
				Saxagliptina	Onglyza
				Linagliptina	Tradjenta
				Alogliptina	Nesina, Vidiopia
				Vildagliptina	Xiliarx, Galvus
Inhibidores de α -glucosidasa	Inhibición de α -glucosidasa intestinal y desaceleran la digestión. ↓ glucosa en sangre	neutro	neutral	Acarbosa Miglitol	Glucobay, Glumida Diastabol, Plumarol
Inhibidores de SGLT 2	Disminuyen reabsorción de glucosa en filtrado glomerular. ↓ glucosa en sangre	pérdida	neutral	Dapagliflozina	Edistride, Forxiga
				Canagliflozina	Invokana
				Empagliflozina	Jardiance
Análogos de la amilina	Dismuyen glucagón durante la comida y desaceleran el vaciado gástrico. ↓ absorción de glucosa	neutro	moderada/ severa	Pramlintida	Symlin
Quelantes de ácidos biliares	Unión a ácidos biliares y colesterol. ↓ LDL en sangre	neutro	neutral	Colesevelam	Welchol
Tabla 2. Listado de fármacos no insulínicos hipoglucemiantes, actualmente aprobados por la FDA y EMA para el tratamiento de la Diabetes Tipo 2 (Datos de [103,104]).					

En primer lugar, se encuentra el grupo de los secretagogos que incluye las sulfonilureas y meglitinidas, los cuales estimulan la secreción de insulina mediante el cierre de los canales de K^+ de las células β . Por otro lado, están los fármacos sensibilizantes, como son las biguanidas (la más conocida es la metformina), las tiazolidinedionas y los agonistas de la dopamina 2. Todos ellos,

incrementan la sensibilidad a insulina en el tejido muscular y graso, mediante diferentes mecanismos: la activación de la enzima AMP-ciclasa, del factor PPAR- γ o activando los receptores dopaminérgicos, respectivamente. Otro grupo de fármacos centran su acción sobre el efecto incretina del GLP-1, éstos son: los análogos del GLP-1 (exenatida, liraglutida, *etc.*) que actúan a través del mismo receptor pero poseen una vida media superior a la del péptido, o los inhibidores de la DPP-4, los cuales logran aumentar la vida media del GLP-1 bloqueando la enzima que le degrada. En último lugar, existe un conjunto de medicamentos que ejercen su efecto hipoglucemiante sin afectar ni a la secreción ni a la sensibilidad insulínica. Dentro de este gran grupo se encuentran los inhibidores de la α -glucosidasa —enzima que disgrega los hidratos de carbono en glucosa—, que reducen la absorción del azúcar en el intestino con el consecuente descenso de la glucemia. También se incluyen los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 (SGLT-2), que impiden la reabsorción de la glucosa en el filtrado glomerular. Además se encuentran los análogos de la amilina —hormona pancreática co-secretada con la insulina— que reducen la absorción de la glucosa produciendo saciedad y enlenteciendo el vaciado gástrico. Finalmente, se engloban dentro de este grupo los quelantes de ácidos biliares, que además de reducir los niveles de LDL en plasma, mejoran la glucemia mediante un mecanismo aún desconocido [101–104].

Y por último, está la terapia insulínica. En 1922, los científicos canadienses Dr. Frederick Banting y Charles Best emplearon por primera vez insulina aislada de *Canis familiaris* para tratar con éxito la diabetes en un menor de edad [105]. Desde entonces y caracterizándose por ser una terapia segura, efectiva, bien tolerada y aceptada para el tratamiento a largo plazo de la diabetes, tipo 1 y tipo 2, esta terapia se ha convertido en el tratamiento antidiabético por excelencia, cuya vía de administración es subcutánea. Actualmente existen multitud de variedades de insulinas terapéuticas, caracterizadas en función del tiempo de inicio, el punto de máximo efecto y la duración del mismo, clasificándose en: insulinas de acción rápida (efecto a los 15 min tras su aplicación), regular, intermedia o prolongada (hasta las 24 h) [106].

Para el diseño de las mismas, la conformación estructural de la insulina es fundamental. De manera natural esta hormona es sintetizada en su forma precursora —proinsulina— y almacenada en las vesículas citoplásmicas como hexámero con dos átomos de zinc en su estructura, ya que es la forma más estable; mientras que su forma activa es la monomérica, que muestra una difusión más rápida [107].

La hormona ejerce su efecto a través de la unión del monómero de insulina con su receptor, localizado en las células diana, que en su mayoría se encuentran en el músculo esquelético, hígado y tejido adiposo. El receptor de insulina es una glicoproteína constituida por dos subunidades α , extracelulares y unidas entre sí por puentes disulfuro, donde se encuentra el

sitio de unión de la hormona, y dos subunidades β , transmembrana y en cuya región citoplásmica reside el dominio de actividad tirosina quinasa. La unión de la insulina con su receptor desencadena, principalmente, dos cascadas de señalización intracelulares: la vía de las MAPKs (quinasas activadas por mitógenos) que regula la síntesis de proteínas y proliferación celular y la vía de la PI3K (fosfatidilinositol 3-quinasa) que desembocará en el metabolismo de la glucosa y lípidos. La transducción de la señal hormonal se inicia con la interacción de la insulina monomérica con su receptor, generando un cambio conformacional que produce la autofosforilación de 6 residuos de tirosina de la subunidad β . Esta activación del dominio tirosina quinasa permite el reclutamiento de proteínas sustrato del receptor, tales como Shc o IRS-1 (sustrato 1 del receptor de insulina), y su fosforilación, las cuales despliegan numerosos mecanismos mediante los que la insulina ejercería su acción, dando lugar a múltiples rutas de acción de la hormona en células sensibles a ésta.

En concreto, la proteína Shc a través del complejo Grb2-SOS, activa a la proteína Ras, la cual inicia la ruta de las MAPKs. Mientras que la fosforilación del IRS-1 facilita su unión covalente con la PI3K permitiendo la generación del segundo mensajero PI3P (fosfatidil inositol-3 fosfatasa), el cual a su vez activa a la quinasa piruvato deshidrogenasa (PDK-1) que fosforila a las enzimas PKB y PKCs atípicas [108–110]. De este modo se activaría la externalización de vesículas citoplásmicas en cuya membrana se localizan proteínas encargadas de la captación de glucosa para su posterior metabolización, denominadas glucotransportadores (Glut).

Dado que la glucosa es un sustrato esencial para el metabolismo celular, puesto que es la molécula fundamental para la obtención de energía en forma de ATP, estas proteínas transportadoras cobran especial relevancia en la fisiología de las células. En humano se reconocen 14 miembros de la familia de transporte de glucosa facilitado, la cual incluye transportadores para otros sustratos diferentes a la glucosa como son la fructosa, mioinositol o urato [111]. Los diferentes Gluts difieren en sus características cinéticas (*v.g.* km), así como en especificidad de sustrato y su perfil de expresión en los tejidos [111,112]. Las isoformas más estudiadas son: Glut-1, Glut-2, Glut-3 y Glut-4. El Glut-1 es el más ampliamente distribuido, principalmente presente en eritrocitos y células endoteliales, y el responsable del transporte constitutivo de glucosa. El Glut-4 es el principal transportador sensible a insulina, localizado específicamente en el tejido muscular esquelético, cardíaco y en el adiposo [113,114].

Particularmente, en los adipocitos de la línea murina 3T3-L1 y epididimarios de rata donde se expresan ambas isoformas de transportadores, en respuesta a la insulina se induce la translocación tanto del Glut-1 como del 4, desde una localización intracelular a la membrana plasmática [115–117]. El proceso se detiene cuando el transportador, una vez ejercida su acción, se interna de nuevo y se almacena en las vesículas citoplásmicas [115–118]. En tejido adiposo de

ratas obesas se han descrito disminuciones en los niveles de ARNm de Glut-1 y Glut-4; mientras que en ratas con diabetes inducida mediante estreptozotocina (STZ), solamente se observa reducción en la expresión del último [119]. Varias observaciones indican el papel crucial del Glut-4 en la homeostasis general de la glucosa. La primera, es que se ha descrito que la alteración en el transporte de glucosa, tanto en músculo como en tejido adiposo, prevalece en estados de insulino-resistencia, incluyendo la obesidad y la DT2 [111,120]. En segundo lugar, se ha detectado que la interrupción de la expresión del Glut-4 en ratones genera resistencia a insulina [121]. Por último, la sobreexpresión del Glut-4 ha demostrado mejorar la diabetes en modelos de ratones transgénicos con genotipo diabético (*db/db*) [122].

Como se ha mencionado, en respuesta a la insulina, los niveles de Glut-4 aumentan en la membrana plasmática lo cual eleva, de manera inmediata, la tasa de transporte de glucosa, particularmente en músculo entre 10-20 veces [117,118,123]. De este modo, este glucotransportador es el responsable de la disminución de los niveles postprandiales de glucosa plasmática [112,123]. El Glut-4, también media la captación de la hexosa en respuesta a otros estímulos diferentes a la insulina, por ejemplo, la sacarosa, el vanadato, fosfoinositolglicanos, agentes hipoglucemiantes como las sulfonilureas, la dexametasona y la contracción muscular [124–128].

También se ha documentado que la translocación de este glucotransportador puede estar mediada por rutas alternativas que tienen lugar en paralelo o junto con la vía de la PI3K. Específicamente, en la línea de adipocitos 3T3L1 el receptor de insulina una vez activado, puede fosforilar y por ende, activar una proteína G resultando en la activación de Cdc42 y PI3K [129]. Por otro lado, se ha descrito que la activación de varios receptores acoplados a proteína G (GPCRs), resultan en la translocación del Glut-4 [130,131]. No obstante, a pesar de que este glucotransportador es la isoforma más sensible a la insulina, se han encontrado hallados casos en los que la mediación por los GPCRs es independiente a la hormona, *v.g.*: activación de β 2-ADR o del receptor de endotelina [132,133].

Los GPCRs son proteínas conformadas por 7 dominios transmembrana, altamente conservados, a diferencia de su sitio de unión al ligando, que presenta una extraordinaria diversidad, lo que confiere al GPCR la capacidad de poder unirse a una plétora de señales, las cuales engloban fotones, iones, estímulos sensoriales, lípidos, péptidos, quimioquinas, nucleótidos, neurotransmisores y hormonas [134]. Esta diversidad de ligandos permite a los GPCRs mediar en casi la totalidad de los procesos biológicos clave [135]. Por ese motivo, se encuentran involucrados en múltiples enfermedades —cáncer de próstata, asma, fallo cardíaco, hipertensión, diabetes— por lo que son la diana terapéutica preferente para muchas de estas patologías; es más, se estima que los GPCRs median la acción del 40 % de los medicamentos actuales [136,137].

La unión del ligando al GPCR se traduce en un cambio conformacional que induce interacciones entre su dominio intracelular y moléculas de señalización como son las subunidades de proteínas G o las β -arrestinas, las cuales a su vez, modulan la actividad de enzimas (*v.g.*: adenilciclase o PLC) y canales iónicos [136]. Estos efectores incrementan o reducen las concentraciones de segundos mensajes tales como AMP cíclico (AMPc), inositol trifosfato (IP3), diacil glicerol (DAG), calcio, *etc.*

La proteína G heterotrimérica —que se compone de las subunidades α , β , γ — es activada mediante un cambio catalizado por el GPCR resultando en la unión de una molécula de GTP a la subunidad $G\alpha$, lo que permite la disociación de esta subunidad del dímero $G\beta\gamma$ [138]. Se ha comprobado, que ambos productos, activan respuestas de manera independiente [138]. Aunque existen varias isoformas de cada una de las subunidades, se pueden diferenciar cuatro clases principales, cada una de las cuales inducen diferentes respuestas celulares. La clase $G\alpha_s$ induce estimulación de la enzima adenil ciclase, la cual incrementa los niveles de AMPc intracelulares; en cambio, la clase $G\alpha_{i/o}$ inhibe dicha enzima mientras que estimula a las MAPKs. La activación de la clase $G\alpha_{q/11}$ causa la estimulación de diferentes enzimas PLC, cuya función es hidrolizar fosfolípidos de la membrana generando como productos IP3 y DAG. La liberación de estos segundos mensajeros conlleva a la elevación de los niveles intracelulares de calcio y a la estimulación de PKC y PKD-1. De manera adicional, esta subclase de proteína G, puede incrementar la activación de las enzimas PI3K y PKB. La clase de proteína $G\alpha_{12/13}$, más recientemente descrita, se ha observado que está implicada en la activación de proteínas de la familia de las Rho GTPasas [139].

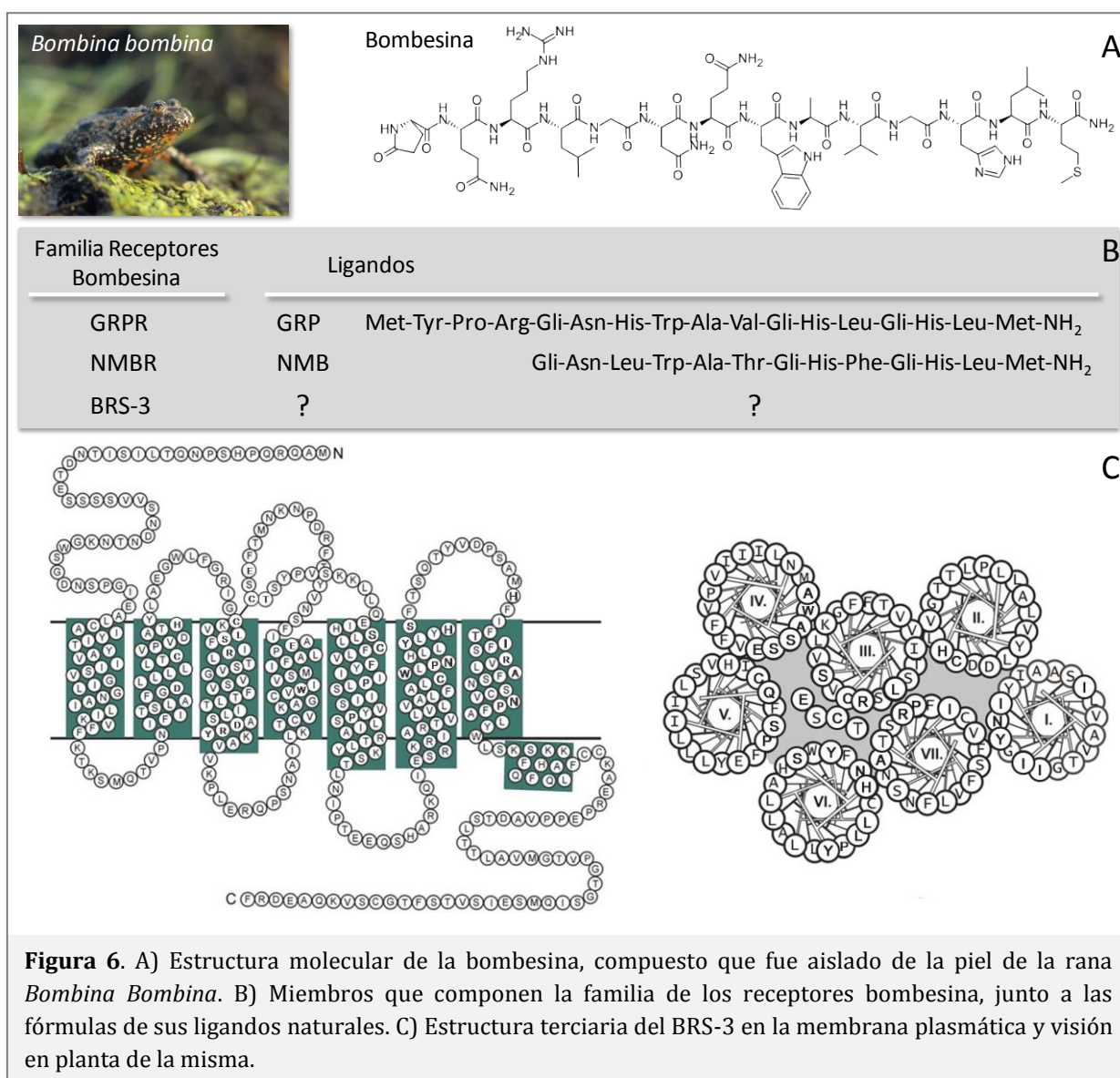
En los islotes pancreáticos del ratón, se han descrito altos niveles de expresión de más de una veintena de receptores GPCRs [140], *v.g.*: en la célula β se expresan el receptor β_2 -ADR —cuyo ligando es la epinefrina—, el receptor de serotonina-2B (HTR2B) o el receptor del GLP-1. Éstos y otros receptores están involucrados en la función de los islotes pancreáticos, tanto normal como alterada por la diabetes, lo que les convierte en pieza clave en el desarrollo de nuevos enfoques terapéuticos [141]. Este tema ha sido revisado en detalle por Ahren y colegas en 2009, describiendo que uno de los casos con mayor éxito en el tratamiento de la DT2, ha utilizado como diana molecular el receptor del GLP-1, el cual ya se ha mencionado anteriormente, al describir las aproximaciones farmacológicas para la terapia de la DT2 [142].

Recientemente se ha propuesto otro GPCR, el receptor Bombesina Subtipo-3 (BRS-3), como potencial diana terapéutica para el tratamiento de la obesidad y la diabetes, debido a su implicación en ambas patologías [143]. El modelo de ratón knockout (KO), cuya expresión del gen codificante para el receptor BRS-3 se encuentra inhibida, se caracteriza: por una reducción de la tasa metabólica, un incremento de los niveles de leptina en suero, por desarrollar hipertensión,

hiperfagia y una obesidad leve y por mostrar deterioro del metabolismo de la glucosa. Cuando los animales alcanzan 20-24 semanas, la obesidad progresa y la secreción de la hormona del crecimiento se reduce en un 46 %, mientras que el nivel de insulina se eleva significativamente, lo que apunta a la existencia de alteraciones en el transporte de glucosa, la lipogénesis y la lipólisis [144]; entre las semanas 27 y las 34, la diferencia de peso es evidente entre los ratones modificados genéticamente y los no modificados, siendo muy relevante el aumento de la cantidad de TAB en los primeros —en concreto, los paquetes de grasa epididimaria, inguinal y retroperitoneal—. En humanos, específicamente en músculo esquelético, se ha asociado una disminución de la expresión del receptor BRS-3 con los estadios alterados metabólicamente como la obesidad y la diabetes [145,146].

El BRS-3 es el tercer miembro de la familia de los receptores bombesina, a la que pertenecen también los receptores GRPR —receptor del péptido liberador de gastrina— y el NMBR —receptor del péptido neuromedina B— [147]. La bombesina (Bn) es un compuesto aislado de la piel de la rana *Bombina Bombina*, identificado en 1970 mediante un cribado sistemático de péptidos bioactivos (Figura 6 A). Su estructura presenta 14 aminoácidos (Pir-Gln-Arg-Leu-Gli-Asn-Gln-Trp-Ala-Gli-His-Leu-Met-CONH₂) y sus primeras acciones farmacológicas se describen en el músculo extravascular liso de la rata [148]. Debido a esto último, se inició la búsqueda de homólogos de la Bn en los tejidos de mamíferos, resultando en la identificación de dos péptidos estructuralmente relacionados con la Bn: péptido liberador de gastrina (GRP) y neuromedina B (NMB), que ejercen sus acciones a través de los receptores GRPR y NMBR, respectivamente [147,149–152]. Sin embargo, el receptor BRS-3 no posee ligando natural conocido (Figura 6 B), por lo que se le cataloga como receptor huérfano [147]. Fue clonado en 1992 del útero de cobaya y mediante estudios de hidropaticidad se demuestra que es una proteína de 7 dominios transmembrana en α -hélice, de 399 aminoácidos (cuya conformación espacial se muestra en la Figura 6 C), y que presenta una homología de secuencia del 51 y 47% con el GRPR y el NMBR, respectivamente [147,153,154]. El gen que codifica su expresión en humanos se localiza en la región cromosómica Xq25-q26, tiene un tamaño de 4,5 Kb y la información genética se distribuye en tres exones y dos intrones [153,155,156].

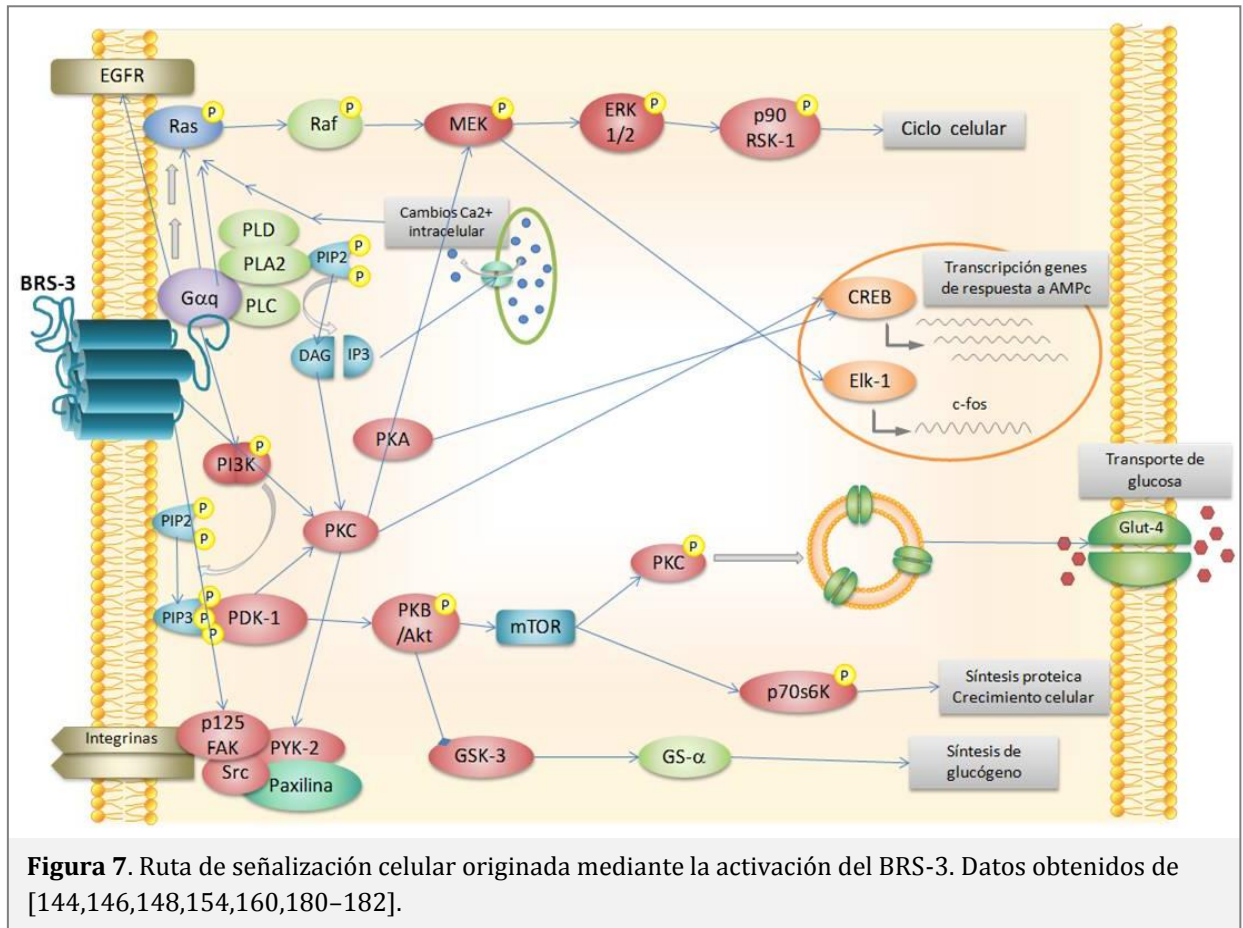
La expresión más notable del receptor BRS-3 en los seres humanos tiene lugar en el cerebro, el útero de las mujeres embarazadas y en el músculo cardíaco; también hay un alto nivel de su ARN mensajero (ARNm) en el músculo esquelético, donde el receptor es funcional [145]. En menor medida es la que se describe en tejido adiposo y mínimamente detectable en el riñón y la piel ([157], www.genecards.org). En la rata, se ha detectado mayoritariamente en el testículo y en la fase secundaria de maduración de los espermatozoides, [153]; sin embargo, se ha documentado que el BRS-3 está presente en el islote pancreático del ratón pero no en el de la rata [158].



A pesar de los numerosos esfuerzos realizados para identificar el ligando natural del receptor BRS-3, éste no ha sido hallado. No obstante, no parece tener similitudes estructurales con los péptidos relacionados con la Bn, ya que el BRS-3 en todas las especies caracterizadas —humana, cobaya, rata, oveja, ratón—, presenta por ellos una baja afinidad [147,159]. Este factor ha dificultado el estudio de la farmacología del receptor, su papel fisiológico y su implicación en procesos patológicos, haciendo necesario el desarrollo de agonistas sintéticos para avanzar en la investigación del mismo. En concreto, la modificación de la Bn que deriva en el compuesto [D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, muestra una alta afinidad por el BRS-3, pero reducida selectividad, ya que su capacidad de unión al GRPR y al NMBR es elevada en todas las especies [160–164]. Utilizando como base la estructura del agonista universal del BRS-3, [D-Tyr⁶, β-Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄, se introducen modificaciones con el objetivo de aumentar la afinidad y la selectividad del agonista, teniendo como resultado, v.g. el compuesto [D-Tyr⁶, (R)-Apa¹¹, 4Cl-Phe¹³, Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄] [165]. Por otro lado, en el grupo de agonistas no-peptídicos, es destacable el

N1-(2-feniletil)-(2R)-2-([(1S)-1-(benzylcarboxamido) etil]carboxamido)-3-(1H-3 indolil) propanamida, que favorece tanto la translocación de la β -arrestina a la membrana plasmática, como la internalización del receptor BRS-3 [166,167]. Además, el interés en desarrollar agonistas del BRS-3, se ha visto potenciado debido a su clara implicación en enfermedades metabólicas; por lo que varias compañías farmacéuticas, entre las que se encuentra *Merck Research Laboratories*, han sintetizado el compuesto 2-(4-{2-[5-(2,2-dimetilbutil)-1H-imidazol-2-yl]etil}fenil)piridina (Bag-1). El ligando es capaz de reducir la ingesta de alimentos y por tanto disminuir el peso corporal de ratones, mientras que en humanos induce aumentos de la secreción de insulina estimulada por glucosa en los islotes pancreáticos y mejora la homeostasis del azúcar [158,168]. Un compuesto también relevante en esta temática y el agonista mejor estudiado *in vivo*, es el MK-5046, cuya formulación es [(2S)-1,1,1-trifluoro-2-[4-(1H-pirazol-1-l)fenil]-3-(4-{[1(trifluorometil) ciclopropil]metil}-1H-imidazol-2-il)propan-2-ol] [169]. Este agonista demuestra mejorar el peso y la tasa metabólica, tanto en modelos animales como en humanos; no obstante, induce efectos cardiovasculares secundarios transitorios, que han limitado su proyección terapéutica [170,171]. Posteriormente, iniciando otra nueva aproximación al desarrollo de agonistas del receptor BRS-3 los investigadores de *Daiichi Sankyo Co. Ltd.* han descrito una serie de análogos quirales de la diazepina, los cuales funcionan como selectivos agonistas de alta afinidad para el receptor BRS-3. Estos compuestos presentan una baja penetrancia en el cerebro, debido a lo cual pueden carecer de los efectos secundarios observados en los ensayos con MK-5046 y ser empleados como agentes anti-obesidad potencialmente útiles [172,173]. En lo que se refiere a los antagonistas del receptor BRS-3, únicamente se describe el Bantag-1 (Boc-Phe-His-4-amino-5-ciclohexil-2,4,5-trideoxipentonil-Leu-(3-dimetilamino) bencilamida trifluoroacetato de N-metilamonio), un potente y selectivo compuesto para el receptor en el humano, rata y en el ratón ([158,168,174], www.guidetopharmacology.org).

Aunque la modulación del receptor BRS-3 una vez activado (Figura 7), no ha sido estudiada en detalle, se postula que su patrón es común a la del resto de receptores Bn debido a su elevada homología de secuencia —fosforilación, internalización y reciclaje, desactivación y desensitización—[175,176]. Un ejemplo es la activación de PLC, que resulta en la estimulación de cambios en las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} , la generación de diacilglicerol y la activación de diferentes PKCs [147,159,165,177–180]. Específicamente en el caso del GRPR y del NMBR, la activación de la PLC es principalmente acometida a través del acoplamiento a las familias $G_{q/11}$ y $G_{12/13}$ de las proteínas G heterotriméricas [181]. La activación de los receptores Bn, estimula un amplio número de vías de señalización, incluyendo la activación de la fosfolipasa D y A2, de pequeñas proteínas de unión a GTP tales como Rho, de la proteína quinasa D (PKD) y de diversos canales iónicos [147,179,182–186].



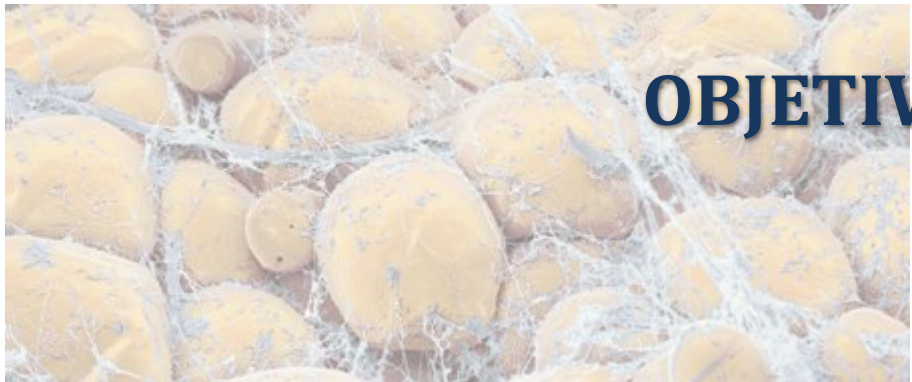
En el caso del BRS-3, su activación incluye la ruta de señalización de las MAP quinasa, y la transactivación del receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR), mediador relevante de los efectos relacionados con los procesos de proliferación, específicamente en tejidos neoplásicos [147,178,180,184,187-190]. En células Balb3T3 transfectadas con el receptor humano BRS-3, estudios con los agonistas [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ y MK-5046 han mostrado incrementos en la fosforilación de las p42/p44 MAPKs y de la PKB. Específicamente en cultivo primario de miocitos de sujetos sin alteraciones del metabolismo de la glucosa, obesos y/o DT2, donde se expresa el receptor de forma nativa, el agonista [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ aumenta la actividad de la PI3K y la fosforilación de las enzimas p42/p44 MAPKs, p70s6K y p90 RSK-1, quinasas involucradas, a su vez, en la ruta de señalización de la insulina [120,146]. En este mismo conjunto de células, mediante estudios *in vitro*, se describe que el ligando [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄, potencia incrementos en los niveles de ARNm y proteína del Glut-4 así como del propio receptor; parámetros que también son aumentados en presencia de insulina [145].

Aunque el agonista [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄, presenta alta afinidad y potencia para activar tanto el receptor BRS-3, como el GRPR y el NMBR, los efectos inducidos relacionados con la señalización, el transporte y metabolismo de la glucosa, son exclusivamente mediados a

través del BRS-3, ya que estudios de silenciamiento del ARNm del receptor en miocitos humanos, muestran ausencia de respuesta cuando el receptor es silenciado [145].

En resumen, la bibliografía referida al receptor BRS-3 muestra que tanto en modelos animales y en humanos, como en estudios *in vitro* e *in vivo*, la participación del receptor es significativa y relevante en los procesos metabólicos, originando con su disrupción alteraciones de carácter metabólico, como la obesidad, y presentando indicios de su función en procesos implicados en la metabolización de la glucosa, relacionándolo con la diabetes [144,145,191]. Además, el ligando sintético [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ ejerce, exclusivamente a través del receptor BRS-3, acciones insulino-miméticas que mejoran la homeostasis del azúcar.

Para acometer el desarrollo del sistema BRS-3/ligando sintético [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ como opción terapéutica, se hace necesario profundizar en la presencia del receptor y sus características de acción en los tejidos involucrados en la homeostasis de la glucosa, así como su participación en patologías que conllevan alteraciones en el metabolismo de la hexosa. En este sentido, el tejido adiposo constituye un órgano clave, además de tratarse de un tejido metabólicamente alterado en ambas patologías [54].



OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

En este trabajo se evalúa la presencia del receptor BRS-3 en el tejido adiposo de modelos animales experimentales y muestras humanas en diferentes estadios metabólicos. En adipocitos aislados de rata y en una línea celular de adipocitos humanos, ambos tipos celulares sin alteraciones metabólicas, estudiamos la activación del BRS-3 por el agonista sintético, así como el transporte de glucosa y las variaciones del metabolismo lipídico inducido por el mismo.

De forma específica, los objetivos de este trabajo han sido:

- Evaluar los niveles de expresión del receptor BRS-3 en tejido adiposo de modelos animales experimentales —insulino-resistencia, hiperlipidemia, DT2 y DT1—, y en muestras de tejido adiposo humano —obesidad y DT2— respecto al grupo control —sin alteraciones metabólicas—, la evaluación de los niveles de expresión del receptor BRS-3.
- Identificar posibles mutaciones y/o polimorfismos en el gen que codifica al receptor BRS-3 en muestras de tejido adiposo humano —obesidad y DT2—.
- Determinar en adipocitos aislados de rata y en la línea celular de adipocitos humanos —sin alteraciones metabólicas— el efecto del ligando [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹, Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, a través del receptor BRS-3, sobre:
 - A) La expresión del receptor BRS-3.
 - B) Los mecanismos de señalización intracelular.
 - C) La expresión del GLUT-4 y el transporte de glucosa.
 - D) El metabolismo lipídico —lipogénesis—.



MATERIAL Y MÉTODOS

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Muestras del estudio.

Para la realización de este estudio se han empleado muestras procedentes de rata y de humano. Específicamente, tejido adiposo y adipocitos.

4.1.1 Muestras de rata.

4.1.1.a Tejido adiposo epididimario de rata.

Las muestras de tejido adiposo corresponden a paquetes de grasa epididimaria extraídos de ratas *Wistar* macho de 12 semanas de edad.

Como referencia se utilizaron un grupo de ratas normales (N), es decir, sin alteraciones metabólicas. Para llevar a cabo el estudio se desarrollaron distintos modelos animales, tales como insulino-resistencia (IR), hiperlipidemia (HL) y diabetes tipo 2 (DT2) y tipo 1 (DT1). En total, se emplearon 10 ratas N, 10 ratas con IR, 9 ratas con HL, 8 con DT y 9 con DT1.

Los protocolos normalizados de trabajo fueron realizados de acuerdo a la legislación, tanto europea como española, regida por la directiva europea 2010/63/EU y el Real Decreto 53/2013, respectivamente, y aprobados por el Comité de uso animal del Instituto de Investigaciones Sanitarias Fundación Jiménez Díaz.

Reactivos

- Albúmina de suero bovino (BSA), *Fisher Scientific S.L* (Waltham, EE.UU.)
- D-fructosa, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- Estreptozotocina, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Forane, *Abbot Laboratories S.A* (Illinois, EE.UU.)
- D(+)-glucosa anhidra, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- Insulina de cerdo, *Novo Biolab* (Bagsvaerd, Dinamarca)
- Pentobarbital sódico, “Tiobarbital”, *B. Braun Melsungen AG* (Melsungen, Alemania)
- Suero salino fisiológico (0,9% NaCl), *B. Braun Melsungen AG* (Melsungen, Alemania)
- Dieta hipercalórica y de alto contenido en grasas, denominada dieta de “cafetería”:
 - Comida:
 - pienso estándar “EU Rodent Pellet Diet 14 %”, *LabDiet* (San Luis, EE.UU.)
 - beicon, *Oscar Mayer* (Chicago, EE.UU.)
 - galletas “María”, *Fontaneda Mondelez Comercial S.L.* (Madrid, España)

- paté “La Piara Tapa Negra”, *Tapa negra S.A.* (Manlleu, España)

- **Bebida:**

- leche entera en polvo, *Central Lechera Asturiana* (Pdo. de Asturias, España.)
- azúcar blanca, *Azucarera* (Madrid, España)
- complejo mineral y vitamínico de chocolate “Meritene”, *Nestlé* (Vevey, Suiza).

Materiales

- Glucómetro, *ARKRAY Inc.* (Kioto, Japón)
- Tiras reactivas de glucosa, *ARKRAY Inc.* (Kioto, Japón)
- Catéter femoral, *ALZET®* (Cupertino, EE.UU)

Animales

- Rata *Wistar* macho de 8 semanas de edad.

4.1.1.a (i) Grupo de ratas control.

Se mantuvieron ratas *Wistar* de 8 semanas de edad, con dieta estándar y agua *ad libitum* durante cuatro semanas. En todos los casos, los animales se mantuvieron en compartimentos separados de los otros modelos de experimentación generados. La analítica en sangre que presentaban las ratas control era: 101 ± 9 mg/dl de glucosa, $1,6 \pm 0,2$ ng/ml de insulina, 68 ± 3 mg/dl colesterol total y 109 ± 6 mg/dl triglicéridos.

4.1.1.a (ii) Inducción de resistencia a la insulina en ratas.

Para desarrollar el modelo animal de insulino-resistencia, se llevó a cabo el procedimiento descrito por Cancelas y colaboradores en 2008 [192]. Este método consiste en alimentar de manera crónica a ratas *Wistar*, a partir de las 3 semanas de vida, con dieta estándar —pienso y agua *ad libitum*—, combinada con D-fructosa diluida en el agua al 20 %. Trascurridos 65 días y tras un ayuno de 15 h, se les realiza un pinzamiento hiperinsulinémico-euglicémico durante 90 min, como ha sido descrito por Escrivá y colaboradores en 1997 [193]. Para ello, las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (460 µg/gr animal) de forma intraperitoneal. A tiempo cero se inyectó vía intravenosa, a través de un catéter insertado en la vena femoral 0,4 mU de insulina por hora y por gramo de peso del animal, disuelta en suero salino con 0,2 % BSA y con D-fructosa al 20 %, a una tasa inicial de 0,5 ml/h. Seguidamente se les midió la glucemia cada 5 min en muestras de sangre (5 µl) recogidas a través del catéter insertado en la arteria carótida. La cantidad de glucosa perfundida se modificó con el fin de mantener la glucemia con valores cercanos a los basales. La tasa de glucosa infundida necesaria para

mantener estable los valores glucémicos se empleó para determinar el índice de eliminación de glucosa ($M = \text{mg glucosa}/\text{min} \cdot \text{kg animal}$), como indicador de la resistencia a la insulina. La analítica en sangre que presentaban las ratas insulino-resistentes era: $89 \pm 4 \text{ mg/dl}$ de glucosa y $3,0 \pm 0,2 \text{ ng/ml}$ de insulina.

4.1.1.a (iii) Inducción de hiperlipidemia en ratas.

El modelo de rata hiperlipidémica se desarrolló siguiendo el protocolo previamente establecido por Prats y colaboradores en 1989 [194]. Consiste en mantener a las ratas con 6 semanas de edad, durante 5 semanas con una dieta hipercalórica y con alto contenido en grasas, llamada de “cafetería” y agua *ad libitum*. Cada día se suministró para cada 3 ratas: 18 bolas de pienso acompañado de 30 gr de beicon cortado en trozos de $2 \times 2 \text{ cm}$ y 6 galletas untadas con 21 gr de paté. Además los animales disponían de 300 ml de leche suplementada. Cada día se eliminaron los restos del anterior y se renovaron los alimentos y la bebida. Las ratas se pesaron cada semana y no se observó aumento significativo del peso comparado con las ratas normales. La analítica en sangre que presentaban las ratas hiperlipidémicas era: $115 \pm 3 \text{ mg/dl}$ de glucosa, $1,3 \pm 0,2 \text{ ng/ml}$ de insulina, $94 \pm 3 \text{ mg/dl}$ colesterol total y $147 \pm 17 \text{ mg/dl}$ de triglicéridos.

4.1.1.a (iv) Inducción de diabetes tipo 2 en ratas.

La diabetes tipo 2 se indujo en las ratas siguiendo el modelo descrito por Portha y colaboradores en 1979, e Iwase y colaboradores en 1987 [195,196]. Consiste en una sola dosis de estreptozotocina de $100 \mu\text{g}/\text{gr}$ peso del animal, disuelta en suero fisiológico 0,9 % NaCl salino y administrada de forma intraperitoneal en las primeras 24 h de su nacimiento. Para discriminar las ratas diabéticas de las no diabéticas, a las 6 semanas se les realizó un test de tolerancia a la glucosa por sobrecarga intravenosa. Para ello, se anestesió a las ratas con pentobarbital sódico (50 mg/kg) mediante inyección intraperitoneal y se les realizó una incisión en la epidermis del área inguinal para dejar al descubierto la arteria femoral. Se les inyectó, durante no más de 30 s una solución salina –0,9 % NaCl– con $0,05 \text{ mg glucosa}/\text{gr}$ peso animal. Posteriormente, se iniciaron las mediciones de glucosa en sangre a diferentes tiempos –0, 5, 10, 20, 30, 50 y 70 min–. La muestra de sangre para la medición se obtuvo por sección del extremo de la cola del animal. Los resultados se expresaron con el índice K, se trata de una medida de la desaparición de la glucosa en sangre por unidad de tiempo ($T_{1/2}$). Este valor es el resultante de dividir el logaritmo neperiano de 2 por el tiempo necesario para que el nivel de glucemia descienda a la mitad de su valor; la fórmula es la siguiente: $K = (\ln 2 / T_{1/2}) \times 100$ [197]. Se determinaron como diabéticas tipo 2 aquellas ratas que

mostraron tener una constante de desaparición de la glucosa (K) menor a 2,5 [198]. La analítica en sangre que presentaban las ratas diabéticas tipo 2 era: glucosa de 153 ± 14 mg/dl y $0,7 \pm 0,1$ ng/ml de insulina.

4.1.1.a (v) Inducción de diabetes tipo 1 en ratas.

Se indujo diabetes tipo 1 en ratas según el protocolo previamente descrito por Rodbell y colaboradores en 1961 [199]. Se inyectó a ratas *Wistar* machos de 10 semanas de edad $60 \mu\text{g/gr}$ peso animal de estreptozotocina (STZ) de forma intraperitoneal, diluida en un tampón de citrato de sodio 0,05 M y pH 4,5 a una concentración final de $22 \mu\text{g STZ/gr}$ peso animal. La solución se preparó 5 min antes de su uso y se mantuvo en hielo. Transcurridos 4 días, se realizó una medición de la glucemia de las ratas, mediante un glucómetro, con una gota de sangre extraída por sección del extremo de la cola del animal. Aquellas con una glucemia mayor de 400 mg/dl se determinaron diabéticas.

4.1.1.a (vi) Obtención de muestras de tejido adiposo animal

Una vez los animales alcanzaron la edad de 12 semanas, fueron sacrificadas por sobreenestesia inhalada, Forane. Seguidamente, mediante disección del animal, se extrajeron los paquetes de grasa epididimarios y se dejaron inmersos en suero fisiológico 0,9 % NaCl, previamente refrigerado. A continuación, se retiraron aquellas partes de tejido no adiposo, como son los cordones espermáticos, vasos deferentes y restos vasculares. Durante el sacrificio se les extrajo una muestra de 3 ml de sangre que fue analizada por el Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Fundación Jiménez Díaz.

4.1.1.b Adipocitos epididimarios de rata.

Las muestras de tejido adiposo corresponden a paquetes de grasa epididimaria extraídos de ratas *Wistar* macho de 8-10 semanas de edad; todas ellas mantenidas con dieta estándar y *agua ad libitum*. Para el estudio, se emplearon 72 ratas.

Reactivos

- BSA, *Fisher Scientific S.L.* (Waltham, EE.UU.)
- CaCl_2 , *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Colagenasa P, *Roche* (Basilea, Suiza.)
- D(+)-glucosa anhidra, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- Forane, *Abbot Laboratories S.A* (Illinois, EE.UU.)
- Hepes, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- HNaCO_3 , *Merck KGaA.* (Darmstadt, Alemania)

- KCl, *Scharlab S.L.* (Barcelona, España)
- KH_2PO_4 , *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- NaCl, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- Suero salino fisiológico (0,9 % NaCl), *B. Braun Melsungen AG* (Melsungen, Alemania)

Medios

- KRB: NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, KH_2PO_4 1,18 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,18 mM, HNaCO_3 25 mM, CaCl_2 2,5 mM, Hepes 5,46 mM, D(+)-glucosa anhidra 1,67 mM.

Material

- Aguja de 22G x 3 ½", *Cadence Science®* (Staunton, EE.UU.)
- Baño termostático con agitador ASR-V, *Kühner* (Birsfelden, Suiza)
- Bombona de carbógeno, *Air Liquide* (Paris, Francia)
- Centrífuga manual, *Eisco Labs* (Ambala Cantt, India)

El aislamiento de adipocitos se realizó siguiendo el procedimiento previamente descrito por Rodbell y colaboradores [200]. Primeramente, se sacrificaron las ratas por sobredosis de Forane inhalado y se les extrajeron los paquetes de grasa epididimaria, los cuales se conservaron en suero fisiológico hasta su procesamiento (Figura 8).

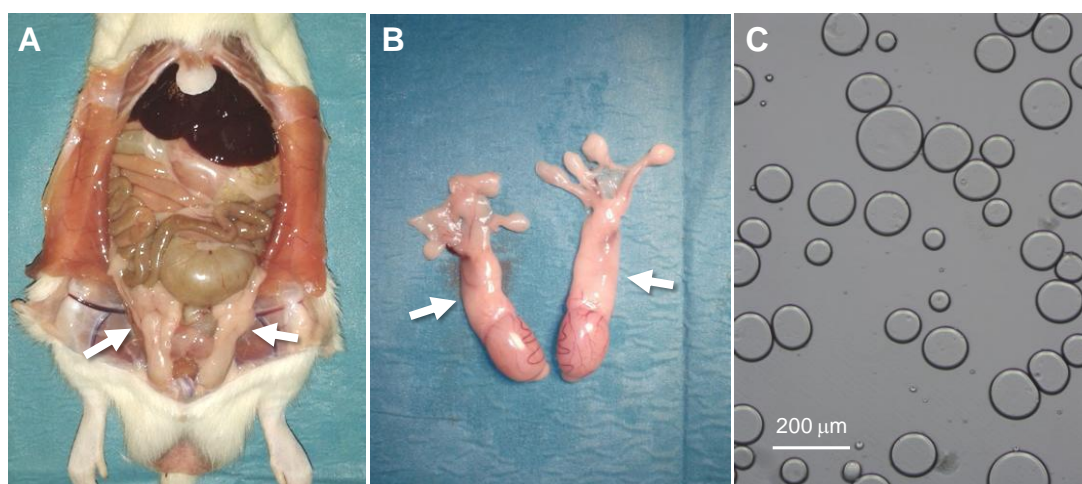


Figura 8. A) Tejido adiposo epididimario de rata en disección de una rata *Wistar* de 8 semanas. B) Paquetes de grasa epididimarios extraídos. C) Adipocitos aislados de dicho tejido, vista a microscopio de contraste de fase —10x—.

Los paquetes de grasa epididimarios se trituraron con tijeras quirúrgicas inmersos en una solución de 2 ml de medio KRB 3 % BSA con 4 mg de collagenasa P. Se incubaron durante un máximo de 10 min en un baño termostático a 37 °C con agitación fuerte y gaseo

continuo de carbógeno (5-10 % CO₂ + 90-95 % O₂), hasta que la solución se volvió turbia y densa. El digerido se pasó a través de una malla que ayuda a disgregar los cúmulos de tejido restantes y se lavó en medio KRB 3 % BSA. Posteriormente se realizó el conteo de las células en una cámara Neubauer diluyendo una muestra de adipocitos a 1:20 en KRB 3% BSA con 5 % de Azul de Tripán, tinción para diferenciar células viables.

4.1.2 Muestras de humano.

4.1.2.a Tejido adiposo visceral.

Medios

- Suero salino fisiológico (0,9% NaCl), *B. Braun Melsungen AG* (Melsungen, Alemania)

Materiales

- Crioviales 2 ml, *Corning® Costar®* (Corning, EE.UU)

En el estudio se emplearon muestras de grasa de humano, las cuales corresponden a tejido adiposo visceral procedente de un total de 22 sujetos normales –entendiendo por normal aquel que no sufre alteraciones en el metabolismo de la glucosa– (SN), 66 obesos –IMC > 30kg/m²– (OB) y 58 diabéticos tipo 2 (DT2). Todos ellos sometidos a una cirugía no relacionada con el estudio, tal como tiroidectomía, hernia inguinal, cirugía bariátrica o vascular, respectivamente. En la Tabla 3 se muestran las características metabólicas de los sujetos incluidos en este estudio.

	OB	DT2	SN
nº hombres/mujeres	26 / 40	20 / 38	12 / 10
Edad (años)	47 ± 1	65 ± 2	55 ± 2
IMC (kg/m²)	47 ± 1 [‡]	24 ± 1	25 ± 1
Glucosa (mg/dl)	125 ± 6 [‡]	147 ± 6	97 ± 2
Colesterol (mg/dl)	192 ± 6	171 ± 7	169 ± 8
HDL-Cholesterol (mg/dl)	53 ± 3	59 ± 13	61 ± 3
LDL-Cholesterol (mg/dl)	124 ± 4	107 ± 16	118 ± 6
Triglicéridos (mg/dl)	141 ± 8 [‡]	135 ± 7 [‡]	89 ± 8
Diagnosis DT2 (año)	–	2010-2015	–
Tratamientos	–	Insulina ^Y	–

Tabla 3. Características metabólicas de los sujetos normales y pacientes obesos y diabéticos tipo 2 incluidos en este estudio. Valores expresados como media ± EEM; [‡] p<0,0001 vs. SN. ^Y Los pacientes diabéticos recibían una dosis diaria de insulina, correspondiente a 9 unidades de Insulina NovoRapid® FlexPen® 100 U/ml.

Los pacientes DT2 participantes, recibían una dosis diaria de insulina (9 unidades, *NovoRapid® FlexPen®* 100 U/ml). Las muestras se mantuvieron en suero salino fisiológico donde se eliminaron restos de tejido no adiposo. Posteriormente se almacenan a -80 °C, sin medio, hasta el momento de su procesamiento.

4.1.2.b Adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

Medios

- Omental Adipocyte Medium (OM-AM): DMEM/Ham's F-12 (1:1), HEPES pH 7,4, Suero fetal bovino (FBS), biotina, pantotenato, insulina humana, dexametasona, penicilina, estreptomycin, anfotericina B; *Zen-Bio Inc.* (Morresville, EE.UU.)
- Omental Basal Medium (OM-BM): DMEM/Ham's F-12 (1:1), HEPES pH 7,4, biotina y pantotenato; *Zen-Bio Inc.* (Morresville, EE.UU.)
- Omental Differentiation Medium (OM-DM): OM-AM, isobutil-metilxantina (IBMX) y PPAR α ; *Zen-Bio Inc.* (Morresville, EE.UU.)
- Omental Preadipocyte Medium (OM-PM): DMEM/Ham's F-12 (1:1), HEPES pH 7,4, FBS, penicilina, estreptomycin, anfotericina B; *Zen-Bio Inc.* (Morresville, EE.UU.)

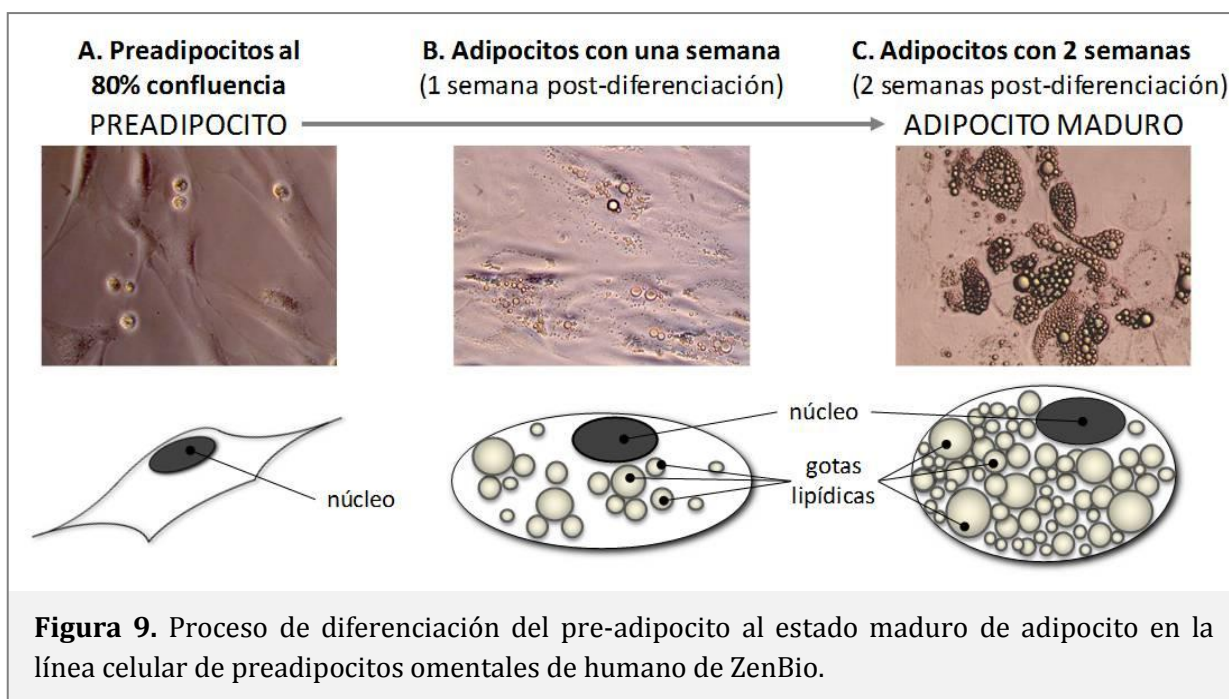
Materiales

- Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc.* (Palo Alto, CA, EE.UU.)
- Incubador de CO₂, *RSBiotech* (South Newmoor, Escocia)
- Placas petri 60 mm diámetro, *Corning® Costar®* (Corning, EE.UU.)
- Placas 24 pocillos, *Corning® Costar®* (Corning, EE.UU.)

Por otro lado, se emplearon adipocitos humanos procedentes de un total de 4 líneas celulares de pre-adipocitos viscerales humanos, suministradas por Zen-Bio. Las células fueron obtenidas de sujetos donantes, ninguno de los cuales presentaba alteraciones en el metabolismo de la glucosa, siendo la media de edad de todos ellos de 51 \pm 7 años y presentando un IMC promedio de 21 \pm 1 kg/m². Los pre-adipocitos fueron aislados de tejido adiposo de las regiones del omentum, del mesentéreo y de la zona perirrenal.

Los pre-adipocitos se recibieron en crioviales congelados en medio específico (OM-PM), los cuales se almacenan en nitrógeno líquido hasta su uso.

El proceso de diferenciación de los pre-adipocitos en adipocitos maduros (Figura 9), está patentado por *Zen-Bio* (nº patente US 6153432).



Se comenzó con la siembra de los pre-adipocitos. Para ello, se descongelaron los viales a temperatura ambiente y se sembraron en las placas de cultivo, en las que se llevaron a cabo los diferentes experimentos, con el medio de pre-adipocitos (OM-PM) recomendado por el fabricante *Zen-Bio*. Las células se mantuvieron a 37 °C, atmósfera O₂/CO₂ de 95/5 % y 96 % de humedad. Cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia, es decir, un tiempo estimado de 48 h, se indujo la diferenciación cambiando el medio de pre-adipocitos por el medio de diferenciación (OM-DM). Se mantuvieron en el incubador durante dos semanas, reemplazando el medio una vez a la semana. Pasado ese tiempo, se observaron al microscopio comprobando la correcta diferenciación a adipocitos maduros. Una vez obtenidos, permanecieron en el incubador hasta su uso en medio de adipocitos (OM-AM) —en todos los casos este periodo no superó las 24 h—.

4.2 Reactivos e inhibidores.

Para los estudios a desarrollar con el receptor Bombesina BRS-3 se empleó un péptido agonista sintético cuya fórmula es: [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄. Además, se hizo uso de una serie de inhibidores para el análisis de las diferentes proteínas implicadas en las principales rutas de señalización celular; éstos fueron: Wortmanina —inhibidor de la vía PI3K/PKB—, PD98059 —inhibidor de MAPKs— y Rapamicina —inhibidor de mTOR—.

Además del BRS-3, en este mismo tejido, también se expresan otros receptores análogos y pertenecientes a la misma familia de receptores bombesina como son el GRPR y NMBR. Por tanto, para el estudio de la implicación del receptor BRS-3 en el transporte de la glucosa y la lipogénesis

celular y teniendo como objetivo demostrar que todos los resultados obtenidos únicamente son consecuencia de la activación del receptor de estudio, se emplearon compuestos que bloquearon a los receptores análogos. En el caso del GRPR se usa el [D-Phe⁶]bombesina₆₋₁₄ metil éster y para el NMBR el inhibidor denominado PD168568 diclorohidrato. De manera adicional, para los estudios de especificidad del BRS-3, se empleó el antagonista Bantag-1. Además, para el estudio del transporte de glucosa, se empleó la micotoxina Citocalasina B, la cual inhibe el transporte de glucosa no dependiente de transportadores.

En último lugar y como control positivo, en todos los experimentos, se utilizó insulina de cerdo a concentraciones fisiológicas, es decir a 10^{-9} M.

Reactivos

- [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, *Anaspec* (Fremont, EE.UU)
- Insulina de cerdo, *Novo Biolab* (Bagsvaerd, Dinamarca)

Inhibidores

- Wortmanina, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Rapamicina, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- PD98059, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- [D-Phe⁶]bombesina₆₋₁₄ metil éster –ME–, donado por el Dr. Robert T. Jensen de los Institutos Nacionales de la Salud, NIDDK-NIH en Bethesda (Maryland, EE.UU.)
- PD168568 diclorohidrato, *Tocris Bioscience* (Bristol, Inglaterra)
- Bantag-1, donado por el Dr. Robert T. Jensen de los Institutos Nacionales de la Salud, NIDDK-NIH en Bethesda, (Maryland, EE.UU.)
- Citocalasina B, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)

4.3 Expresión génica.

La expresión génica del receptor BRS-3 se estudió tanto en el tejido adiposo como en los adipocitos de ambas especies estudiadas, rata y humano. Además, en adipocitos se analizó la expresión génica del Glut-4.

El estudio se llevó a cabo en piezas de tejido adiposo visceral de sujetos SN y de pacientes OB, DT2 y en grasa epididimaria de ratas N, HL, DT2 y DT1. También se realizó este estudio en adipocitos aislados de grasa epididimaria de rata y en adipocitos viscerales diferenciados de línea celular de humano, ambos tipos celulares estimulados o no con el agonista del receptor BRS-3 a concentraciones de 10^{-10} M, 10^{-9} M y 10^{-8} M.

4.3.1 Estimulación celular.

Reactivos

- [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, *Anaspec* (Fremont, EE.UU.)
- Insulina de cerdo, *Novo Biolab* (Bagsvaerd, Dinamarca)

Medios

- KRB 1 % BSA
- OM-BM, *Zen-Bio Inc.* (Morresville, EE.UU.)

Materiales

- Aguja de 22G x 3 ½", *Cadence Science®* (Staunton, EE.UU.)
- Baño termostático con agitador ASR-V, *Kühner* (Birsfelden, Suiza.)
- Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc* (Palo Alto, CA, EE.UU.)
- Incubador de CO₂, *RSBiotech* (South Newmoor, Escocia)

Las estimulaciones llevadas a cabo para el estudio de la expresión génica de los receptores BRS-3 y Glut-4, se detallan a continuación para cada uno de los tipos celulares en los que se realizó.

4.3.1.a En adipocitos epididimarios de rata.

Una vez aislados los adipocitos del tejido epididimario de rata, como se detalla en el apartado 4.1.1.b, fueron distribuidos en tubos de cristal, utilizando entre 1,5 y 2 millones de células en cada uno. Éstos se resuspendieron en 1,5 ml de KRB 1 %. Se les añadió el agonista del BRS-3 en concentraciones de 10⁻¹⁰ M a 10⁻⁸ M. Se realizó la incubación en un baño termostático a 37 °C con agitación moderada y continua. Puesto que los adipocitos, debido a su contenido elevado en lípidos, tienden a ascender en un medio acuoso; cada tubo, además, se agitó cada 5 min de forma manual para facilitar la distribución de los adipocitos por el medio, y por ende, asegurar una homogénea estimulación. Trascurrida una hora, se paró la estimulación pasando los tubos a 4 °C. Se centrifugaron los tubos suavemente, en frío y sin freno a 3 g durante 1 min, para evitar la ruptura de los adipocitos y resuspensión de los mismos. Se retiró el medio con ayuda de una jeringa y aguja de 22G de 9 cm y se resuspendieron en 1 ml de medio KRB frío sin BSA. Esta última operación se realizó una vez más y se eliminó todo el medio de los adipocitos para almacenarlos a -80°C hasta su procesamiento.

4.3.1.b En adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

Los preadipocitos de la línea celular se sembraron en placas petri de 60 mm, a razón de 40.000 células/cm², siguiendo las recomendaciones del proveedor, los cuales fueron diferenciados a adipocitos según se ha descrito previamente en el apartado 4.1.2.b. Los adipocitos diferenciados, se lavaron con medio OM-BM y se les añadió el péptido agonista del BRS-3, ambos en las mismas concentraciones empleadas para los adipocitos aislados de rata. Se incubaron las células durante una hora a 37 °C y atmósfera O₂/CO₂ de 95/5 % y 96 % de humedad. La reacción se detuvo a 4 °C y se eliminó el medio con los estímulos, seguido de un par de lavados con medio OM-BM. Las células se procesaron inmediatamente.

4.3.2 Aislamiento de ARN mensajero.

Para hacer el estudio de la expresión génica, primeramente, se debe aislar el ARNm tanto de los tejidos como en las células. Una vez obtenido, se retrotranscribe a ADN complementario (ADNc) para la determinación del nivel de expresión de los genes de interés.

Reactivos

- 2-propanol, *Scharlau S.A.* (Barcelona, España)
- Cloroformo, *Scharlau S.A.* (Barcelona, España)
- Dietilpirocarbonato (DEPC), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Etanol, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- TRI Reagent®, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)

Medios

- Agua-DEPC: 0,1 % DEPC, agua destilada.
- Etanol 75 % en agua destilada
- OM-BM, *Zen-Bio Inc.* (Morresville, EE.UU.)

Materiales

- Centrífuga 5424R, *Eppendorf AG.* (Hamburgo, Alemania)
- Placas petri 60 mm diámetro, *Corning®* (Corning, EE.UU.)
- Politron T-1500, *Ystral* (Ballrechten-Dottingen, Alemania)
- Espectrofotómetro “Nanodrop ND-1000”, *Nucliber* (Madrid, España)
- Raspadores de placa, *Corning®* (Corning, EE.UU.)

Para aislar el ARNm se empleó el reactivo comercial *TRI Reagent®* y se siguió el protocolo recomendado para cada caso por el mismo fabricante. Todo el procedimiento de extracción se

realizó con materiales estériles y en condiciones de esterilidad para evitar posibles degradaciones por ARNasas o contaminaciones.

El protocolo consta de tres fases: una primera fase de homogenización de la muestra, cuyo proceso es diferente para tejido o para células; una segunda fase de separación del ARN y una última fase de aislamiento del ARN.

4.3.2.a Preparación de la muestra.

4.3.2.a (i) En adipocitos epididimarios de rata.

Se añadió un mililitro de *TRI Reagent*® a los adipocitos previamente estimulados y a los que se les ha retirado el medio como se ha detallado en la sección 4.3.1.b. Esta solución se homogenizó con el politrón, se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4 °C y se recogió la interfase en un tubo diferente.

4.3.2.a (ii) En piezas de tejido adiposo de rata y de humano.

Se homogenizó con politrón piezas de aproximadamente 200 mg de tejido adiposo, tanto de rata como de humano, con 1 ml del reactivo TRI Reagent®. Se centrifugaron los homogenizados a 12.000 g durante 10 min a 4 °C, para retirar material insoluble como lípidos y restos celulares. Resultó una fase superior, que corresponde al contenido lipídico del tejido, una interfase, correspondiente al reactivo, donde se encuentran el ARN y las proteínas, y un precipitado de restos celulares. Se transfirió la interfase a otro tubo, evitando recoger parte de la fase lipídica.

4.3.2.a (iii) En adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

Los adipocitos diferenciados, previamente estimulados, como se ha descrito en el apartado 4.3.1.b, se lavaron con medio OM-BM y se les añadieron 500 µl de *TRI Reagent*®. Se rasparon las placas para levantar los adipocitos adheridos y lisar las células. El lisado celular se centrifugó a 12.000 g durante 10 min a 4 °C y se recogió la fase intermedia.

4.3.2.b Separación y aislamiento del ARNm.

Una vez recogida la interfase del TRI Reagent® en la que se encuentran el ARN y las proteínas, se dejó reposar las muestras 5 min a temperatura ambiente (TA), con el fin de asegurar la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas. Posteriormente se añadieron 200 µl de cloroformo por cada ml de TRI Reagent® empleado. Se agitó enérgicamente durante 15 s y después de incubar 3 min a TA se centrifugaron a 12.000 g

durante 15 min a 4 °C. Esta centrifugación separa en fases los diferentes componentes celulares, de modo que resultó: una fase orgánica inferior en la que se encuentran las proteínas, una interfase que contiene el ADN y una fase superior con el ARN disuelto. Se recogió esta última y se añadieron 500 µl de 2-propanol por ml de TRI Reagent® utilizado, mezclando por inversión del tubo. Se incubó la solución 10 min a TA, para permitir que el ARN precipite y se centrifugó de nuevo a 12.000 g durante 10 min a 4 °C. Se obtuvo un precipitado, que corresponde al ARN. Se lava el ARN, descartando el sobrenadante por inversión y añadiendo 1 ml de etanol al 75 % por ml de TRI Reagent® utilizado en la primera etapa del protocolo. Se despegó el precipitado sometiendo el tubo a pulsos con el agitador. Se centrifugó por última vez a 7.500 g durante 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante por inversión, dejando secar el precipitado durante no más de 15 min, evitando que quede completamente seco, caso que dificultaría la solubilización del ARN. Se resuspendió el precipitado en 30 µl de agua-DEPC fría e inmediatamente se introdujo el tubo en hielo, para evitar la degradación del ARN solubilizado. Por último se almacenaron los ARN a -80 °C hasta su procesamiento.

El ARN extraído de cada muestra se cuantificó espectrofotométricamente mediante el sistema *Nanodrop*. Se empleó una alícuota de 2 µl de muestra para realizar la medición. El grado de pureza de las muestras se calculó por el cociente de las absorbancias a 260 y 280 nm; es decir, A_{260}/A_{280} [201]. Se excluyeron aquellas muestras cuyo grado de pureza estimado es menor de 1,7.

4.3.3 Síntesis de ADN complementario.

El ARNm aislado se utilizó como molde para sintetizar una copia de ADN complementario al ARN (ADNc), el cual es molécula monocatenaria. Este proceso denominado retrotranscripción, se realizó mediante la acción de la ADN polimerasa transcriptasa inversa o retrotranscriptasa. Para retrotranscribir el ARN de las muestras se empleó un kit comercial –High-Capacity cDNA Archive Kit– siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

Reactivos

- High-Capacity cDNA Archive Kit, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)

Medios

- Medio de retrotranscripción (RT): 2 µl de RT Buffer 10x, 0,8 µl de dNTPs 25x, 2 µl de 10x RP, 1 µl de Multiscribe™ Reverse Transcriptasa y 4,2 µl de agua-DEPC.

Materiales

- Termociclador Mastercycler personal 5332, *Eppendorf AG*. (Hamburgo, Alemania)

Se diluyeron 4 µg de ARN en 20 µl de agua DEPC a los que se añadieron 20 µl de medio RT. Todo el proceso se llevó a cabo en frío para evitar degradaciones del ARN. La retrotranscripción se realizó en un termociclador: primero durante 10 min a 25 °C, seguidamente 120 min a 37 °C y por último durante 2 min a 95 °C. El ADNc obtenido se almacenó a -20 °C hasta su procesamiento.

4.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real.

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR, consiste en la amplificación gracias a la acción de la enzima ADN polimerasa de los fragmentos de los genes de interés, determinados por la posición de los cebadores empleados en cada caso. Específicamente, en esta reacción y gracias a la sonda fluorófora SYBR Green I, molécula con afinidad por la doble cadena de ADN, se puede detectar el aumento del número de fragmentos de doble cadena conforme van amplificándose a tiempo real. Esta amplificación aumenta de manera exponencial y proporcional a la cantidad de fragmentos de ADNc de los que consta la muestra.

Reactivos

- Cebadores para BRS-3 (Directo: 5'GGCAGTTGTGAAGCCACTTGA y reverso: 5'AGACGCAGCCAGCTTTTACAC), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Cebadores para Glut-4 (Directo: 5'GCCTGCCAGAAAGAGTCTGAAG y reverso: 5'AGCACGACCGCAATGATCA), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Cebadores para 18S (Directo: 5'ATGCTCTTAGCTGAGGTGCCCCG y reverso: 5'ATTCCTAGCTGCGCTATCCAGG), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal, *Kapa Biosystems*, (Wilmington, EE.UU.)

Materiales

- Micro Amp™ placa óptica 48 pocillos, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)
- Micro Amp™ Optical Adhesive Film pocillos, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)
- Termociclador, StepOne™ Real Time PCR System, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)

Para la detección de la expresión de los receptores BRS-3 y Glut-4 se empleó el kit comercial KAPA SYBR® FAST qPCR Kit Master Mix (2X) Universal. Para normalizar los valores de cada muestra, se utilizó como control endógeno la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La reacción se realizó en placas de 48 pocillos en los que se mezclaron 2 µl de ADNc, 0,4 µl del fluorocromo Rox —normaliza la señal de SYBR Green—, 4 pmol de cada cebador —directo y reverso—, 10 µl de KAPA SYBR Master Mix —mezcla que contiene DNA polimerasa, tampón de reacción, deoxinucleótidos (dNTPs), fluorocromo SYBR Green I y MgCl₂ 2,5 mM—.

La PCR a tiempo real se comenzó con una etapa preparatoria al inicio del proceso de 95 °C durante 2 min. La siguiente etapa es donde se realizaron los 48 ciclos en las siguientes condiciones: 15 s a 95 °C para la fase de desnaturalización, 30 s a 60 °C para la fase de hibridación y en la última fase, de elongación, se desarrolló a 72 °C durante 40 s. En ésta última etapa es donde se realizaron las mediciones de las sondas fluorescentes, SybrGreen, Kapa Sybr y Rox. Para finalizar una última fase de desnaturalización a 95 °C durante 15 s y otra fase de terminación de la reacción a 60 °C durante 1 min.

4.3.5 Cálculos de la expresión génica.

Los cálculos de la expresión génica se realizaron siguiendo el método comparativo Ct, por sus siglas en inglés *cycle threshold*, mediante el cual se evalúan cambios relativos en los niveles de ARNm entre dos muestras. Los valores Ct son determinados por la identificación del ciclo en el cual la emisión de la intensidad de la sonda fluorescente se eleva por encima de la señal de fondo en la fase exponencial de la reacción de la PCR. Por tanto el valor Ct está representado por el ciclo en el cual la producción de fluorescencia cruza el umbral establecido. Los resultados se expresaron como n-veces de los valores de ARNm, como se ha descrito previamente por Livak y Schmittgen [202].

4.4 Secuenciación génica.

Se realizó un análisis genético en muestras de tejido adiposo de pacientes con alteraciones metabólicas (OB y DT2). En concreto se secuenciaron la región 5' UTR y los 3 exones de los que está formado el gen *BRS-3*. La reacción de secuencia se fundamenta en el método enzimático de Sanger. Los dideoxinucleótidos se encuentran marcados con distintos fluorocromos, los cuales van a permitir que el secuenciador automático y mediante una electroforesis capilar, primeramente se separen por tamaño los amplicones y, en segundo lugar, se determine la secuencia de la región amplificada.

4.4.1 Aislamiento y medición de ADN genómico.

Reactivos

- Kit de aislamiento ADN "DNeasy Blood & Tissue kit", *Qiagen* (Valencia, EE.UU.)

Materiales

- Espectrofotómetro "Nanodrop ND-1000", *Nucliber* (Madrid, España)

Para llevar a cabo la secuenciación en primer lugar se aisló el ADN genómico de 200 mg de tejido adiposo visceral empleando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue kit, siguiendo las instrucciones detalladas por el fabricante.

Seguidamente, mediante el espectrofotómetro *Nanodrop*, se testó la calidad del ADN genómico extraído, la cual viene determinada por la cantidad de ADN que contenga la muestra y la pureza de ADN en la misma. La absorbancia del ADN es máxima a 260 nm, por lo que valores obtenidos a esa longitud de onda y mediante la fórmula de la Ley de Beer-Lambert, se convierten en $\mu\text{g/ml}$ de ADN en la muestra –DNA ($\mu\text{g/ml}$) = $A_{260} \times 50$ –. La pureza de la muestra se determinó mediante los ratios $A_{260}/280$ y $A_{260}/230$, los cuales miden los restos de proteínas y ARN, respectivamente en la muestra. El rango óptimo de pureza de las muestras se encuentra entre los valores 2,0 y 2,1, resultando una pureza aceptable $\geq 1,8$; muestras con valores fuera de este rango fueron descartadas.

4.4.2 Reacción de amplificación.

Reactivos

- DNA AmpliTools Green Master Mix (2x), *Biotoools* (Madrid, España)
- Cebadores para 5' UTR (5'→3'):
 - Directos: CAGCCTGGATAACTGCAAAG y GCCCCTTAAAAGAAAACATGG
 - Reversos: GCCCCTTAAAAGAAAACATGG y CAGAGAGATGGTGAAGCAACA
- Cebadores para Exón 1 (5'→3'):
 - Directo: TGCTGGGAGACACACAGAAC
 - Reverso: TGTGAGAAAAGCAGAATAGTAGCC
- Cebadores para Exón 2 (5'→3'):
 - Directo: GAGGGTAGAACTGGATGACCA
 - Reverso: CACTGCTATTGCATTTATAAACAGG
- Cebadores para Exón 3 (5'→3'):
 - Directo: TCTCACAGCTAAATGTTTTGTTTTT
 - Reverso: AAGCCCGATGACATTACTATTTG

Materiales

- Lámina adherente para microplaca “MicroAmp™ Clear Adhesive Film” *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)
- Microplaca de 96 pocillos para PCR, *Biologix* (Lenexa, EE.UU.)
- Termociclador, Veriti Thermal Cycler, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)

Posteriormente se llevó a cabo la reacción de amplificación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de las regiones a secuenciar, las cuales fueron la región 5' UTR, comprendiendo los nucleótidos de la secuencia base -1071 al -59, y los 3 exones en su totalidad que conforman el gen *BRS-3*. Para ello se sintetizaron cinco pares de oligonucleótidos de acuerdo a la secuencia humana del gen *BRS-3* y cuya complementariedad y localización se muestran en la figura 10 [203].

Esta reacción se desarrolló en una microplaca de 96 pocillos mezclando 1 µl de ADN genómico, a 10 ng/µl, con 5 µl de DNA AmpliTools Green Master Mix, mezcla que lleva incorporados la polimerasa “Biotools DNA Polimerasa”, los desoxinucleótidos —dATPs, dCTP, dGTP, dTTP—, 2 mM MgCl₂, tampón de reacción, estabilizantes, un medio que contiene un componente que aporta densidad a la mezcla y un colorante azul —que migra con fragmentos de 3-5 kb— y naranja —que migra con fragmentos de 100 pb—. A esta mezcla se le añaden 10 ng de los correspondientes cebadores directo y reverso. Después de sellar la placa con la lámina adhesiva, para evitar su evaporación durante los ciclos, la mezcla se sometió a 35 ciclos de PCR en el termociclador. Cada fase de la que se compone la PCR tiene lugar en unas condiciones específicas. La fase de desnaturalización se llevó a cabo durante 30 s a 94 °C; la fase de hibridación, en el caso de los exones, duró 1 min a 64 °C, mientras que para la región 5'UTR fue 1 min a 63 °C. Por último, se desarrolló la fase de elongación, con una duración de 30 s a 72 °C. Al finalizar los 35 ciclos la PCR se estabilizó a 72 °C durante 6 min y se mantuvo a 4 °C.

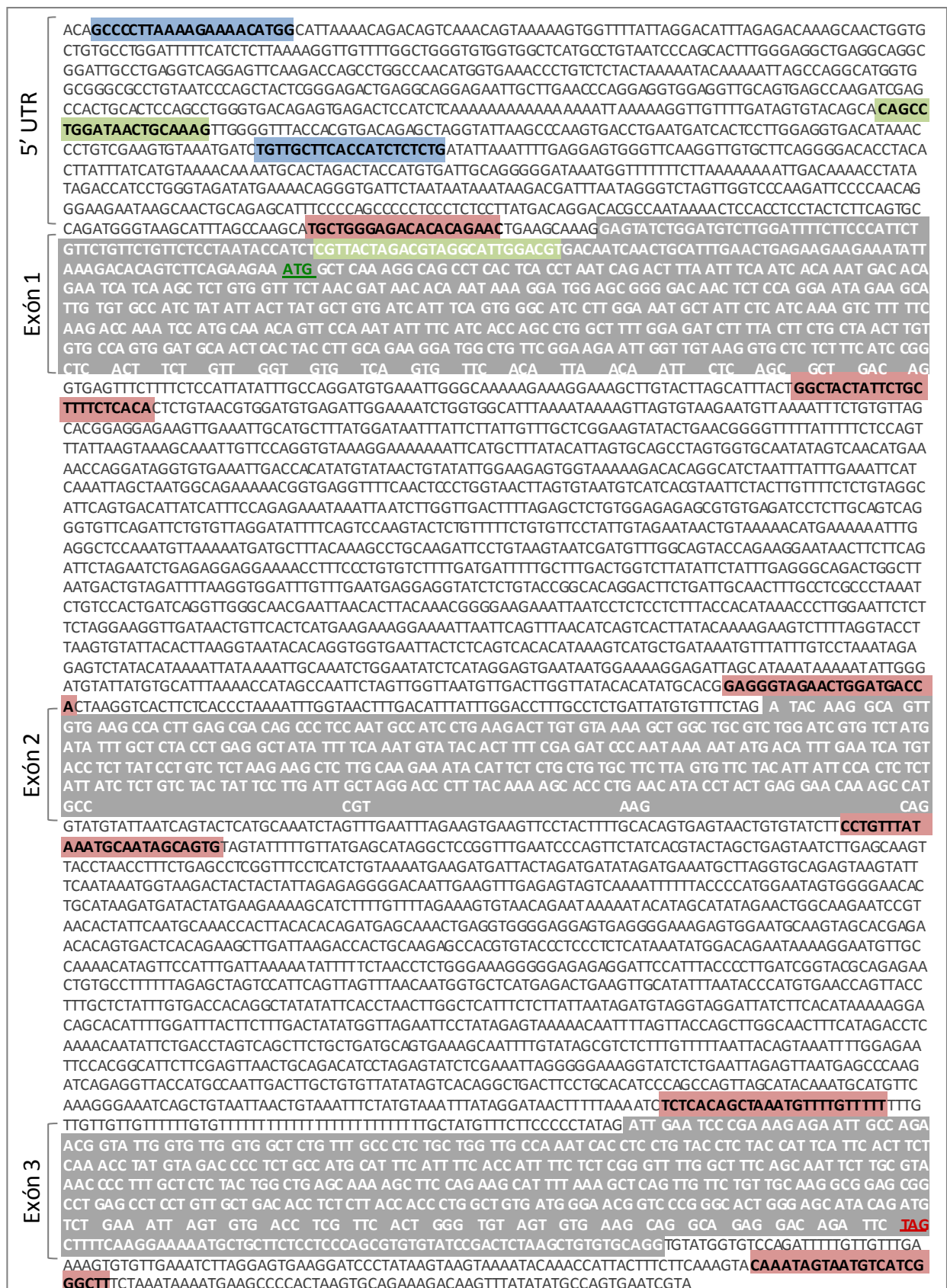


Figura 10. Secuencia del gen *BRS3*, desde el nucleótido -1.134 hasta el +4.515. Se muestran los cebadores empleados para la secuenciación: para la región 5'UTR (■, ■) y para los exones 1, 2 y 3 (■) señalados en gris y los codones de iniciación (verde) y de parada (rojo).

4.4.3 Electroforesis horizontal.

Reactivos

- Agarosa, *Biotoools* (Madrid, España)
- Intercalante ADN “Midori Green Advance”, *Nippon Genetics Europe* (Dueren, Alemania)
- Marcador peso molecular “100bp DNA Ladder H3 RTU”, *Nippon Genetics Europe* (Dueren, Alemania)

Medios

- Tampón TAE 50X, *Lonza* (Verviers, Bélgica)

Materiales

- Cubeta horizontal REAL, *Durviz* (Valencia, España)
- Termociclador, Veriti Thermal Cycler, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)
- Transiluminador UV digital, Amersham Imager 600, *GE Healthcare Life Science Amersham®* (Buckinghamshire, Inglaterra)

Con el objetivo de comprobar la correcta amplificación de los fragmentos, una muestra de cada amplicón fue analizada mediante electroforesis horizontal. Se cargaron 2 µl de producto de PCR sobre un gel de TAE 1,5 % agarosa, inmerso en un medio TAE, y se hizo correr en una cubeta horizontal durante 40 min a 120 V. Se visualizaron los amplicones en el gel mediante un transiluminador UV digital y con las referencias del marcador molecular se verificaron el tamaño de los fragmentos amplificados.

4.4.4 Purificación de los productos de PCR.

Reactivos

- Producto limpieza PCR “ExoSAP-IT”, *Affimetrix* (Santa Clara, EE.UU.)

Materiales

- Termociclador, Veriti Thermal Cycler, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)
- Tubos 0,2 ml, *Eppendorf AG*. (Hamburgo, Alemania)

En cada una de las reacciones de PCR se eliminaron los dNTPs no incorporados empleando el reactivo ExoSAP-IT, que combina la enzima exonucleasa 1, la cual degrada los cebadores y fragmentos de ADN de cadena simple, con la fosfatasa alcalina SAP, que elimina los nucleótidos residuales no incorporados.

Primeramente se diluyó el producto enzimático a 1:3 en agua y en tubos de 0,2 ml se mezclaron 2 µl de la dilución con 2 µl del producto de PCR. Se realizó una incubación a 37 °C

durante 15 min en el termociclador y se paró la reacción con otra incubación de 15 min a 80 °C. Finalizado el proceso se añadieron 8 µl de agua y se midió la concentración de ADN en *Nanodrop*. Los productos purificados se almacenaron a -20 °C hasta su secuenciación.

4.4.5 Reacción de secuenciación.

Reactivos

- Kit de secuenciación “BigDye™ Terminator v1.1 cycle sequencing kit”: Ready Reaction Premix (2.5x), BigDye Sequencing Buffer (5x); *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)

Materiales

- Microplaca de 96 pocillos para PCR, *Biologix* (Lenexa, EE.UU.)
- Termociclador, Veriti Thermal Cycler, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)

Se llevaron 2,5 µl de producto de PCR a una concentración de 50 ng/µl, para la preparación de una mezcla con 5 µl de Ready Reaction Premix, 2 µl de BigDye Sequencing Buffer y 3,2 pmol de cebador directo correspondiente en cada muestra. La reacción de secuenciación se realizó en una placa de 96 pocillos en un volumen total de 20 µl. Tras una incubación de 1 min a 96 °C en el termociclador, se repitieron 25 ciclos de PCR en las siguientes condiciones: fase de desnaturalización a 96 °C durante 10 s, fase de hibridación a 50 °C durante 5 s, fase de elongación 60 °C durante 4 min. Al término de los ciclos, se mantuvieron las muestras a 4 °C.

4.4.6 Secuenciación capilar tipo Sanger y análisis de secuencias.

Materiales

- Secuenciador, ABI 3130xl Genetic Analyzer, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)
- Programa de análisis de secuencias, Sequence Scanner v1.0, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)
- Secuenciador, ABI 3130xl Genetic Analyzer, *Applied Biosystems* (Foster City, EE.UU.)

Finalmente, se secuenciaron los amplicones mediante electroforesis capilar en el secuenciador automático, el cual inyecta las muestras en capilares previamente cargados con el polímero POP7. El polímero permite separar fragmentos de ADN de cadena sencilla con una diferencia de una única base -secuenciación capilar tipo Sanger-. Los resultados son analizados con el software *Sequence Scanner*, con el que se compararon las secuencias obtenidas con la secuencia consenso del gen BRS-3 humano.

4.5 Microscopía confocal.

La técnica de la microscopía confocal permite la visualización en células aisladas diferentes proteínas localizadas con anticuerpos fluorescentes. En nuestro caso se estudió, en células aisladas de grasa epididimaria de rata, la presencia del receptor BRS-3 en la membrana plasmática y cómo ésta se modifica en respuesta a los estímulos que han recibido las células: agonista del receptor e insulina.

Reactivos

- 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- Agua MiliQ, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Anticuerpo anti-BRS-3 conjugado con Alexa Fluor 647, *Bioss Inc.* (Woburn, EE.UU.)
- Mowiol 4-88, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- KCl, *Scharlab S.L.* (Barcelona, España)
- KH_2PO_4 , *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- NaCl, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- Na_2HPO_4 ($2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Suero fetal bovino (FBS), *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris-base), *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)

Medios

- Medio incubación: PBS, 2 % de FBS descomplementado
- Medio de montaje: 2,4 g de Mowiol 4-88, 6 g de glicerol, 6 ml de agua MiliQ, 12 ml de Tris-Base 0,2 M a pH 8,5.
- Tampón fosfato-salino (PBS): NaCl 0,14 M, KCl 2,7 mM, Na_2HPO_4 ($2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 8 mM, KH_2PO_4 1,76 mM, pH 7.

Materiales

- Cubreobjetos redondos, *Menzel-Gläser* (Braunschweig, Alemania)
- Placas 24 pocillo, *Corning®* (Corning, EE.UU.)
- Portaobjetos, *Menzel-Gläser* (Braunschweig, Alemania)
- Microscopio confocal, *Leica Microsystems GmbH* (Wetzlar, Alemania)

4.5.1 En adipocitos epididimarios de rata.

Una vez se estimularon los adipocitos durante una hora como se ha referido anteriormente (apartado 4.3.1.a), las células se lavaron con KRB sin BSA. Se resuspendieron en medio de incubación, PBS 2 % FBS, dejándolos a una concentración de $2 \cdot 10^6$ células/ml. Se traspasaron 400.000 adipocitos a tubos de cristal de 5 ml y se les añadieron los anticuerpos

primarios anti-BRS-3, a concentración de 1/500. Las células se incubaron 1 h a TA, en oscuridad y con agitación constante y se lavaron centrifugándolas a 4 g durante 1 min. Tras dos lavados, las células se resuspendieron en 200 μ l de PBS al 2 % FBS y con 1 μ g/ml de la tinción nucleica DAPI, durante 20 min a TA y oscuridad. Finalmente, tras un lavado se les retiró el medio y se resuspendieron en el medio de montaje Mowiol, previamente atemperado a 37 °C. Las muestras se montaron en un portaobjetos y cubiertas por un cubreobjetos redondo. Para ayudar a homogenizar el grosor de la muestra se dieron unos toques suaves al cristal para expandir la muestra y disminuir el grosor del medio de montaje. Éstas se dejaron secar una hora a TA en ausencia de luz y posteriormente se conservaron a 4 °C en oscuridad.

Finalmente, las células se observaron en un microscopio confocal, en primer lugar con un campo de contraste de fase. Sobre el mismo, se irradiaron las muestras con un láser de diodo para visualizar los núcleos con DAPI y con un láser de argón de 633 nm que permite excitar el fluorocromo AlexaFluor 647. Se comprobó que no había marcaje en el interior celular.

4.6 Expresión proteica.

Se estudió la expresión proteica del BRS-3 en piezas de grasa epididimaria de rata N, IR, HL, DT1 y DT2 y en muestras de tejido adiposo de humano procedentes de SN, OB y DT2. La cuantificación de la presencia del Glut-4 en la membrana plasmática se realizó en adipocitos aislados de rata. Adicionalmente, se analizó la activación de enzimas implicadas en diferentes rutas de señalización celular, fundamentales para la célula, en respuesta a la presencia del péptido agonista del receptor de estudio. Éstas son: PKB, p70s6K, p42/p44 y la p90RSK-1.

4.6.1 Estimulación celular.

Para el estudio de la expresión proteica, las células se estimularon en presencia o ausencia del agonista [D-Tyr⁶- β -Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ a concentraciones de entre 10⁻¹⁰ y 10⁻⁸ M, tal y como se ha detallado en el apartado 4.3.1.a y .b. En este caso las células se incubaron con el péptido durante 3 min para el estudio de las enzimas de señalización ó 1 h para el análisis de receptor BRS-3 y del Glut 4.

Reactivos

- [D-Tyr⁶- β -Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, *Anaspec* (Fremont, EE.UU.)
- BSA, *Fisher Scientific S.L.*, (Waltham, EE.UU.)
- Insulina de cerdo, *Novo Biolab* (Bagsvaerd, Dinamarca)

Medios

- KRB: NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, KH_2PO_4 1,18 mM, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,18 mM, HNaCO_3 25 mM, CaCl_2 2,5 mM, Hepes 5,46 mM, D(+)-glucosa anhidra 1,67 mM.
- OM-BM, *Zen-Bio Inc.* (Morresville, EE.UU.)

Materiales

- Aguja de 22G x 3 ½", *Cadence Science®* (Staunton, EE.UU.)
- Baño termostático con agitador ASR-V, *Kühner* (Birsfelden, Suiza)
- Centrífuga GS-6R, *Beckman Instruments Inc.* (Palo Alto, CA, EE.UU.)
- Incubador de CO_2 , *RSBiotech* (South Newmoor, Escocia)
- Placas petri 60 mm diámetro, *Corning®* (Corning, EE.UU.)
- Raspadores de placa, *Corning®* (Corning, EE.UU.)
- Tubos de cultivo 12x75 mm de cristal de borosilicato, *Corning®* (Corning, EE.UU.)

4.6.1.a En adipocitos epididimarios de rata.

Los adipocitos, una vez aislados del tejido epididimario, se lavaron con medio KRB 1 % BSA dos veces. Posteriormente se distribuyeron $1,5 \cdot 10^6$ células en cada tubo en un volumen final de 1,5 ml. Éstos, se incubaron en un baño termostatzado a 37 °C con agitación continua.

La estimulación se paró en frío. Seguidamente se lavaron las células dos veces con medio KRB sin BSA. Para ello, se centrifugaron a 3 g durante 1 min a 4 °C y se eliminó el infranadante con ayuda de una jeringa. En el último, se retiró el medio completamente y se dejaron los adipocitos en ausencia de medio en el tubo. La muestra se almacenó a -80 °C hasta su procesamiento.

4.6.1.b En adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

Se sembraron en placas petri los pre-adipocitos humanos a razón de 40.000 células por cm^2 . Se diferenciaron siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, detallado en el apartado 4.1.1.b. Los adipocitos diferenciados, se lavaron dos veces con medio OM-BM. A continuación se estimularon con el agonista del BRS-3 a concentraciones de 10^{-10} M hasta 10^{-8} M o insulina en atmósfera de 37 °C, O_2/CO_2 de 95/5 % y 96 % de humedad. La reacción se detuvo a 4 °C y se realizaron dos lavados con medio OM-BM. Inmediatamente se procesaron las células.

4.6.2 Solubilización de proteínas.

Una vez se tienen las muestras, éstas deben procesarse para extraer la proteína y llevar a cabo su análisis. Para ello, se sometieron a un proceso en el que solubilizaron las proteínas

totales de las muestras de tejido procedentes de los distintos modelos animales o de los sujetos con o sin alteraciones metabólicas para analizar la expresión del BRS-3. El mismo procedimiento se realizó en las muestras de adipocitos de ambas especies para evaluar la actividad de enzimas quinasas como respuesta a la estimulación de las células al péptido agonista del receptor de estudio. En el caso del estudio del receptor Glut-4, se extrajeron las proteínas de membrana sólo en adipocitos murinos para la extracción de las proteínas de membrana.

Reactivos

- 2-mercaptoetanol, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- BSA, *Fisher Scientific S.L.* (Waltham, EE.UU.)
- Bacitracina, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Bradford, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- EGTA, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Inhibidor de proteasas, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- KOH, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Leupeptina, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- $MgCl_2$, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- NaF, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- $Na_4P_2O_7$, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Na_3VO_4 , *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Pepstatina, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Sacarosa, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Tris-HCl, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Triton X-100, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)

Medios

- Kit MEM-PER™ Plus Membrane, *Thermo Scientific™* (Waltham, EE.UU.): medio de permeabilización celular (MP), medio de solubilización de membranas (MSM).
- Medio de solubilización (MS): sacarosa 250 mM, tris-HCl 20 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, β -mercaptoetanol 50 mM, EGTA 1,2 mM, Na_3VO_4 1 mM, $Na_4P_2O_7$ 5 mM, NaF 50 mM, bacitracina 30 U/ml, leupeptina 2 μ M, pepstatina 2 μ M, PMSF 2 mM, 1,25 % de tritón pH 7,4.
- PBS

Materiales

- Centrífuga 5424R, *Eppendorf AG.* (Hamburgo, Alemania)

- Lector de placa, Opsys MR, *Cultek S.L.U.* (Madrid, España)
- Poca 96 pocillos, *Corning®* (Corning, EE.UU.)
- Politron T-1500, *Ystral* (Ballrechten-Dottingen, Alemania)
- Raspadores de placa, *Corning®* (Corning, EE.UU.)

4.6.2.a Solubilización de proteínas totales.

4.6.2.a (i) En tejido adiposo.

Se partió de 500 mg de tejido, tanto de rata como de humano. Se añadieron 500 µl de MS y se homogenizó el tejido con politrón. Se incubó el homogenizado durante 30 min en hielo y con agitaciones continuas. Tras una centrifugación a 16.000 g, durante 15 min y a 4 °C, resultó una capa superior densa, correspondiente a los lípidos presentes en el tejido, un infranadante que contenía las proteínas y un precipitado con los restos celulares. Se transfirió el infranadante a un nuevo tubo, con precaución de no recoger parte de la capa superior. El lisado celular se almacenó a -80 °C.

4.6.2.a (ii) En adipocitos epididimarios de rata.

Se añadió 1 ml de MS por cada 1,5-2 millones de adipocitos estimulados y almacenados como se ha descrito en el apartado 4.3.1.a. Se homogenizó incubando durante 30 min a 4 °C y con agitaciones continuas. Tras centrifugar el lisado celular a 16.000 g, durante 15 min y 4 °C, se recogió el infranadante que fue almacenado a -80 °C.

4.6.2.a (iii) En adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

Los adipocitos de línea celular de humano previamente diferenciados y estimulados en placas de 60 mm como se describe en la sección 4.3.1.b, se lavaron 2 veces con PBS. Seguidamente se añadieron 500 µl de MS y se incubaron 30 min en hielo. Tras raspar las placas, el lisado celular se centrifugó a 16.000 g, durante 15 min y a 4 °C y se almacenó el infranadante a -80 °C.

4.6.2.b Solubilización de proteínas de membrana.

Para la extracción específica de las proteínas de membrana se empleó el kit comercial *MEM-PER™ Plus Membrane*, siguiendo las instrucciones del fabricante para el protocolo a seguir.

4.6.2.b (i) En adipocitos aislados epididimarios de rata.

Se necesitaron 5 millones de adipocitos aislados de rata para cada extracción; por ello se reunieron 2 tubos con $1,5 \cdot 10^6$ c/tubo por cada condición de la muestra de adipocitos estimulados con el ligando sintético del BRS-3, tal y como se ha descrito en la sección 4.3.1.a. Sobre las células se añadieron 750 μ l de MP y se incubó durante 10 min a 4 °C. Se recogió el infranadante que contenía las proteínas citosólicas y se almacenó a -80 °C. El precipitado se resuspendió e incubó en 400 μ l de MSM durante 30 min a 4 °C.

4.6.3 Medición de proteína.

Una vez extraídas las proteínas de las muestras, éstas se cuantificaron empleando el método descrito previamente [204]. El reactivo Bradford es una tinción que se une a los aminoácidos que conforman las proteínas y adquiere una tonalidad azul, cuya absorbancia se mide a 595 nm. La medición se realizó en una placa de 96 pocillos, a un volumen final de 250 μ l, con 5 μ l de la muestra diluida en solución 0,5 N de KOH y 25 μ l del reactivo. Se empleó como control estándar diluciones seriadas de BSA.

4.6.4 Electroforesis vertical.

Una vez se han extraído las proteínas de las muestras, éstas se han de separar para poder comenzar con su análisis. La separación de las proteínas se realizó empleando la técnica de electroforesis, mediante la cual las proteínas se separan en función de su peso molecular en un gel de poliacrilamida [205].

Reactivos

- 2-mercaptoetanol, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA), *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Azul de bromofenol, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Acrilamida-Bisacrilamida (1:37,5), *Fisher Scientific* (Waltham, EE.UU.)
- Dodecil sulfato sódico (SDS), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Glicerol 87%, *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Glicina, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)
- Marcador de peso molecular, *Page Ruler, Fisher Scientific* (Waltham, EE.UU.)
- Persulfato de amonio, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)
- Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris-base), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Tetrametil-etileno-diamina (TEMED), *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)

Medios

- Gel de concentración: Tris-base 0,05 M, SDS al 0,1 %, EDTA 2 mM, pH 6,7, 4% bis-acrilamida, 2,8 mM persulfato de amonio y 1% TEMED, pH 6,7
- Gel de resolución: Tris-base 375 mM, 0,1 % SDS, EDTA 2 mM, 10 % glicerol, 8 % acrilamida, 2,8 mM persulfato de amonio y 1 % TEMED, pH 8,9
- Tampón de carga: Tris-base 187,5 mM, 2 % de SDS, 10 % de glicerol, 5 % de 2-mercaptoetanol, 0,0025 % de azul de bromofenol, pH 8,9
- Tampón de electroforesis: Tris-base 50 mM, Glicina 375 mM, 0,1 % de SDS, EDTA 2 mM

Materiales

- Cristales con separadores de 1,5 mm, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)
- Cubeta para geles de electroforesis, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)
- Fuente de alimentación eléctrica, “PowerPac 300”, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)
- Peine para 10 pocillos de 1,5mm, Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)

Se preparó las muestras de proteína diluidas en agua destilada y tampón de carga y se calentaron 5 min a 95 °C. Se cargaron 20 µg de proteína por pocillo en el gel de acrilamida, uno de los pocillos con marcador de peso molecular. El gel está situado en una cubeta vertical la cual se llenó con tampón de electroforesis. Ésta se desarrolló a 40V durante la primera hora, tiempo suficiente para que la muestra atravesase el gel de concentración (4% de acrilamida). Posteriormente se aumentó el voltaje a 120 V durante 90 min, tiempo durante el cual la muestra atraviesa y se separa en el gel de resolución (8% acrilamida). La electroforesis se paró cuando el frente del azul de bromofenol alcanzó el límite inferior del gel.

4.6.5 Transferencia.

Una vez separadas las proteínas por peso molecular en el gel de acrilamida, éstas se transfieren a una membrana donde se va a realizar la inmunodetección.

Reactivos

- Dodecil sulfato sódico (SDS), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- Glicina, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)
- Metanol, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- Tris(hidroximetil)-aminometano (Tris-base), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)

Medios

- Tampón de transferencia: Tris-base 48 mM, glicina 39 mM, 20 % metanol 20 % y 0,0375 % de SDS.
- TBS: Tris-base 10 mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5.

Materiales

- Membrana de nitrocelulosa, *GE Healthcare Life Science Amersham®* (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Papel Whatman “*Extra Thick Filter Paper*”, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)
- Sistema de transferencia, “*Trans-blot SD*”, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)

Se realizó una transferencia de tipo semiseca y de forma eléctrica. Previamente a realizar la transferencia y de forma separada, se dejaron las membranas, los papeles Whatman y los geles, inmersos en tampón de transferencia durante 15 min. Se colocaron los elementos en el sistema como se detalla a continuación: sobre el electrodo positivo se sitúan 3 papeles Whatman, cuyas medidas son mayores que el gel de acrilamida; sobre ellos se colocó la membrana de nitrocelulosa; encima el gel y por último otros 3 papeles Whatman. A continuación se puso en marcha la transferencia con un voltaje de 15 V durante 45 min a TA. Pasado este tiempo, se almacenaron las membranas en medio TBS y a 4 °C.

4.6.6 Inmunodetección de las proteínas.

La inmunodetección o Western Blot, es una técnica mediante la cual se localizan las proteínas sobre la membrana a través de incubaciones con anticuerpos específicos para cada proteína. El sistema de visualización empleado es la reacción de quimioluminiscencia que genera la enzima de rábano picante (HRP) con el peróxido de hidrógeno, compuesto que contiene el sustrato ECL. Esta reacción enzimática emite fotones que velan la película radiográfica. Los anticuerpos primarios y los secundarios específicos empleados en cada caso y sus diluciones se muestran en la siguiente tabla (Tabla 4.). Todos los anticuerpos se diluyen en medio de incubación.

Reactivos

- Anticuerpo anti-PKB fosforilada y total, *Cell Signaling Technology* (Danvers, EE.UU.)
- Anticuerpo anti-BRS-3, *Thermo Scientific Pierce* (Rockford, EE.UU.)
- Anticuerpo anti-Glut-4, *Cell Signaling Technology* (Danvers, EE.UU.)
- Anticuerpo anti-p42/44 MAPK, fosforilada y total, *Cell Signaling Technology* (Danvers, EE.UU.)
- Anticuerpo anti-p70s6K, fosforilada y total, *Cell Signaling Technology* (Danvers, EE.UU.)

- Anticuerpo anti-p90RSK-1 fosforilada, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Anticuerpo anti-Na⁺/K⁺ ATPasa, *Thermo Scientific Pierce* (Rockford, EE.UU)

Proteína	Anticuerpo primario	Dilución	Anticuerpo secundario	Dilución
BRS-3	Anticuerpo policlonal para BRS-3	1:500	Anticuerpo policlonal para IgG de conejo	1:500
Glut-4	Anticuerpo policlonal para Glut-4	1:500	Anticuerpo policlonal para IgG de ratón	1:500
Na⁺/K⁺ ATPasa	Anticuerpo policlonal para Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	1:5000	Anticuerpo policlonal para IgG de ratón	1:500
Tubulina	Anticuerpo monoclonal para tubulina	α- 1:1.000	Anticuerpo policlonal para IgG de ratón	1:500
PKB	Anticuerpo policlonal para PKB, fosforilada y total	1:1.000	Anticuerpo policlonal para IgG de conejo	1:500
p70s6K	Anticuerpo policlonal para p70s6K, fosforilada y total	1:1.000	Anticuerpo policlonal para IgG de conejo	1:500
p42/p44	Anticuerpo policlonal para p42/p44 MAPK, fosforilada y total	1:1.000	Anticuerpo policlonal para IgG de conejo	1:500
p90 RSK-1	Anticuerpo monoclonal para p90 RSK-1	1:5.000	Anticuerpo policlonal para IgG de conejo	1:500

Tabla 4. Anticuerpos primarios y secundarios empleados en WesterBlot, y sus correspondientes diluciones de uso.

- Anticuerpo anti-α-tubulina, *Cell Signaling Technology* (Danvers, EE.UU.)
- BSA, *Fisher Scientific S.L.*, (Waltham, EE.UU.)
- Leche en polvo desnatada, *Central Lechera Asturiana* (Pdo. de Asturias, España.)
- NaCl, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- Reactivos para quimioluminiscencia, ECL Western Blotting Reagents, *GE Healthcare Life* (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Revelador y fijador fotográfico, Lx24 y AL4, *Kodak Eastman* (Rochester, EE.UU.)
- Suero anti-IgG de conejo conjugado con HRP, *GE Healthcare* (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Suero anti-IgG de ratón conjugado con HRP, *GE Healthcare Life Science Amersham®* (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Tris-base, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- Tween 20, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)

Medios

- Medio de bloqueo: TBS, 0,05 % Tween, 2 % leche desnatada en polvo
- Medio de incubación: TBS, 0,05 % Tween, 5 % BSA

- Medio de lavado (TTBS): TBS, 0,05 % Tween,
- TBS: Tris-base 10mM, NaCl 0,15 M, pH 7,5
- Solución reveladora: Lx24 al 20 % en agua
- Solución fijadora: AL4 al 20 % en agua

Materiales

- Casete, “Hypercasete™”, *GE Healthcare Life Science Amersham®* (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Películas de autoradiográfica, *GE Healthcare Life Science Amersham®* (Buckinghamshire, Inglaterra)
- Agitador de balanceo, *Stuart* (Stone, Reino Unido)

Las membranas se mantienen hasta su procesamiento en medio TBS y a 4 °C. Las incubaciones se realizaron sobre una plataforma basculante, para lograr una distribución de los medios lo más homogénea posible sobre la toda extensión de la membrana, y empleando 15 ml de medio en cada caso.

La inmunodetección comenzó realizando un bloqueo de las uniones inespecíficas sobre la membrana de nitrocelulosa; para ello se incubó la membrana en medio de bloqueo durante una hora a TA. Después se aplicó medio de lavado, incubando 15 min cada vez a TA, repitiendo el proceso 3 veces. Seguidamente, se incubó la membrana con el anticuerpo primario específico en cada caso, incubando ésta vez a 4 °C durante toda la noche. Trascurrido este tiempo, se realizaron 3 incubaciones a TA de 15 min cada una con medio de bloqueo. Posteriormente, se lavó la membrana 3 veces y finalmente, se incubó con el anticuerpo secundario específico durante 1 h a TA. A continuación se aplicó 3 veces el medio de lavado y se mantuvo en TBS la membrana hasta el momento de revelado.

Para revelar la membrana, se usó un kit comercial de quimioluminiscencia, siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana se incubó en la solución durante 2 min, con agitación constante. A continuación y en un cuarto oscuro, se colocó la membrana en un casete y sobre ella se expuso una película autoradiográfica. Para revelar la película, ésta se sumergió en la solución reveladora y posteriormente en la fijadora. Por último, se lavó en agua y se dejó secar.

4.6.7 Cuantificación de proteína.

Una vez se ha realizado la inmunodetección, se cuantifican los resultados, es decir, la cantidad de proteína que representa cada una de las bandas que se localizan en la membrana.

Material

- Escáner HP ScanJet 7400c, *Hewlett-Packard Company* (Palo Alto, EE.UU.)
- Quantity One® 1-D, *Bio-Rad Laboratories Inc.* (Hercules, EE.UU.)

La cuantificación se realizó mediante el programa informático *Quantity One*. En primer lugar se escanearon las películas y con el software se seleccionaron de forma manual las bandas de proteína. El mismo programa da unos valores en función de la densidad óptica que detecta en cada área de banda, correspondiendo los valores más altos con las densidades ópticas más altas, y por ende, a las mayores cantidades de proteína. Los resultados se normalizaron con la cantidad de proteína cargada en cada pocillo, la cual viene dada por la enzima total para las quinasas PKB, p70s6K, p42/44. En el caso de la enzima p90 RSK-1 y el BRS-3 se normalizaron con α -tubulina; y el Glut-4 se normalizó con la proteína de membrana Na^+/K^+ ATPasa. Los resultados se expresan en porcentajes respecto del control.

4.7 Transporte de glucosa.

Ese transporte se mide por incorporación de glucosa marcada con el isótopo tritio (^3H), cuya fórmula es 2-deoxi-D-[1, 2- $^3\text{H}(\text{N})$]-glucosa, abreviada como 2-DOG [206]. Se estudió el transporte de glucosa en presencia o ausencia del ligando sintético para el BRS-3 a diferentes concentraciones —desde 10^{-11} M hasta 10^{-7} M— y/o en combinación con los inhibidores Wortmanina a 10^{-6} M, Rapamicina 10^{-7} M o PD98059 a $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. Paralelamente, se emplearon los inhibidores [D-Phe⁶]bombesina₆₋₁₄ metil éster a 10^{-6} M, PD 168568 diclorohidrato a 10^{-6} M y el antagonista Bantag-1 a 10^{-6} M. En todos los experimentos se empleó la Citocalasina B a $1,75 \cdot 10^{-4}$ M.

Reactivos

- 2-deoxi-D-[1, 2- $^3\text{H}(\text{N})$] glucosa, *Hartmann Analytic GmbH* (Braunschweig, Alemania)
- [D-Tyr⁶- β -Ala¹¹, Phe¹³, Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, *Anaspec* (Fremont, EE.UU.)
- BSA, *Fisher Scientific S.L* (Waltham, EE.UU.)
- CaCl_2 , *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- $\text{CH}_3\text{COCOONa}$, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Citocalasina B, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- Ftalato de bis (2-etil/hexilo), *Scharlau S.A.* (Barcelona, España)
- Hepes, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- Insulina de cerdo, *Novo Biolab* (Bagsvaerd, Dinamarca)
- KCl, *Scharlab S.L.* (Barcelona, España)
- Líquido de centelleo, Ultima GoldTM, *PerkinElmer* (Boston, EE.UU.)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)

- NaCl, *Panreac Química S.L.U.* (Castellar del Vallés, España)
- NaH₂PO₄, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- NaOH, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Wortmanina, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- Rapamicina, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- PD98059, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- [D-Phe⁶]bombesina₆₋₁₄ metil éster –ME–, donado por el Dr. Robert T. Jensen de los Institutos Nacionales de la Salud, NIDDK-NIH en Bethesda, (Maryland, EE.UU.)
- PD 168568 diclorohidrato, *Tocris Bioscience* (Bristol, Inglaterra)
- Bantag-1, donado por el Dr. Robert T. Jensen de los Institutos Nacionales de la Salud, NIDDK-NIH en Bethesda, (Maryland, EE.UU.)

Medios

- KRB sin glucosa: KRB: NaCl 118 mM, KCl 4,75 mM, KH₂PO₄ 1,18 mM, MgSO₄·7H₂O 1,18 mM, HNaCO₃ 25 mM, CaCl₂ 2,5 mM, Hepes 5,46 mM.
- BE: Hepes 20 mM, NaCl 120 mM, MgSO₄ 1,2 mM, CaCl₂ 2 mM, KCl 2,5 mM, NaH₂PO₄ y CH₃COCOONa 1 mM, pH 7,4.

Materiales

- Baño termostático con agitador, *JP. Selecta* (Abrera, Barcelona)
- Contador de radiactividad β, “Tri-Carb 2810 TR”, *PerkinElmer* (Boston, EE.UU.)
- Incubador “CO₂ Incubator (med) INCO246med”, *Memmert GmbH + Co. KG*, (Schwabach, Alemania)
- Microcentrífuga, “Beckman Microfuge B”, *Beckman Instruments Inc.* (Palo Alto, CA, EE.UU.)
- Microtubos tipo Beckman de polipropileno, *Kemia Científica S.A.* (Madrid, España)
- Placas 24 pocillos, *Corning® Costar®* (Corning, EE.UU.)
- Raspadores de placa, *Corning®* (Corning, EE.UU.)
- Viales contaje, “Pico Prias Vial, 6 mL”, *PerkinElmer* (Boston, EE.UU.)

4.7.1 Transporte de glucosa en adipocitos epididimarios de rata.

Se incubaron 1·10⁶ adipocitos, previamente aislados de grasa epididimaria de rata, como se ha detallado en la sección 4.1.2.b, en 400 µl de medio KRB sin glucosa con 1 % BSA y durante 15 min en baño termostático a 37 °C. Seguidamente se añadieron 6,5 pmol de 2-DOG (0,16 µCi) y se incubaron 3 min adicionales. Se paró la reacción introduciendo los tubos a 4 °C. Se distribuyeron de cada tubo, 2 muestras de 150 µl en microtubos de 500 µl con 100 µl de ftalato de bis. Éstos se agitaron fuertemente y se centrifugaron a 10.900 g durante 1 min.

Resulta una fase superior con los adipocitos, un supernadante con la fase orgánica, donde se encuentra el ftalato, y una fase acuosa conteniendo la glucosa no captada por las células. Posteriormente se cortó el tubo a mitad de la altura del ftalato y se introdujo la parte superior del tubo en un vial de conteaje. Para realizar el conteaje de la radiación β , se añadieron 4 ml de Ultima Gold™ por vial.

4.7.2 Transporte de glucosa en adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

Se parte de adipocitos ya diferenciados (apartado 4.1.1.b) en placas de 24 pocillos y con medio OM-AM. Se lavaron dos veces las células con medio BE, exento de glucosa, y se dejaron incubando en el mismo durante 16 h, a 37 °C, atmósfera O₂/CO₂ de 95/5 % y 96 % de humedad. A continuación se añadieron tanto los estímulos como lo inhibidores indicados en 4.6.1 y se incubó durante 15 min. Seguidamente se incorporaron 6,5 pmol de 2-DOG (0,16 μ Ci). Trascurridos 5 min, se paró la reacción en frío. Se lavaron 3 veces las células con BE y se levantaron con 500 ml de NaOH 1 N. Se recogieron las células en viales de conteaje a los que se añadieron 4 ml de líquido de centelleo Ultima Gold™.

4.8 Lipogénesis.

El proceso de lipogénesis se estudió mediante el protocolo previamente descrito por Sancho y colaboradores [207]. En dicho protocolo se mide la incorporación de acetato de sodio marcado con el radioisótopo ¹⁴C a los ácidos grasos sintetizados por el adipocito. Se evaluó la implicación del receptor en el proceso de lipogénesis estimulando las células con el agonista [D-Tyr⁶- β -Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ a concentraciones entre 10⁻¹¹ y 10⁻⁸ M. También se estudiaron las rutas de señalización implicadas empleando los inhibidores Wortmanina (10⁻⁶M), Rapamicina (10⁻⁷M) y PD98059 (2,5·10⁻⁵M).

Reactivos

- 1,4 bis(5-fenil-2-oxazolil)benzeno (P.O.P.O.P), *Hopkin & Williams Ltd.* (Swansea, Reino Unido)
- 2,5-Difeniloxazol (P.P.O), *Sigma-Aldrich Co.* (San Luis, EE.UU.)
- [D-Tyr⁶- β -Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, *Anaspec* (Fremont, EE.UU.)
- Acetato de sodio, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Ácido acético, sal sódica, [2-¹⁴C], *PerkinElmer* (Boston, EE.UU.)
- Insulina de cerdo, *Novo Biolab* (Bagsvaerd, Dinamarca)
- NaOH, *Merck KGaA* (Darmstadt, Alemania)
- Wortmanina, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- Rapamicina, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)

- PD98059, *Sigma-Aldrich Corp.* (San Luis, EE.UU.)
- Raspadores de placa, *Corning®* (Corning, EE.UU.)

Medios

- Líquido de centelleo: 1L de Tolueno, 4 g de P.P.O, 500 mg de P.O.P.O.P.
- OM-BM
- PBS

Materiales

- Baño termostático con agitador ASR-V, *Kühner* (Birsfelden, Suiza)
- Baño termostático con agitador, *JP. Selecta* (Abrera, Barcelona)
- Contador de radiactividad β , “Tri-Carb 2810 TR”, *PerkinElmer* (Boston, EE.UU.)
- Incubador “CO₂ Incubator INCO246med”, *Memmert GmbH + Co. KG*, (Schwabach, Alemania)
- Placas 24 pocillos, *Corning® Costar®* (Corning, EE.UU.)
- Viales contaje, “Pico Prias Vial, 6 mL”, *PerkinElmer* (Boston, EE.UU.)

4.8.1 Lipogénesis en adipocitos epididimarios de rata.

Se aislaron los adipocitos tal y como se detalla en el apartado 4.3.1.a y se $1,5 \cdot 10^6$ células distribuidos en viales de contaje, durante 15 min en baño termostático a 37 °C con agitación. La estimulación se realizó en presencia o ausencia del péptido agonista del BRS-3 a diferentes concentraciones desde 10^{-11} hasta 10^{-8} M y en combinación con los diferentes inhibidores, descritos en 4.7. A continuación se añadieron 0,05 μ Ci de ácido acético marcado con ^{14}C y diluido en una solución de acetato de sodio 16 mM, cuya concentración final es de 0,4 mM. La reacción se interrumpió a las 2 horas añadiendo 4ml de líquido de centelleo en cada vial. Éstos se agitaron y una hora después se realizó el contaje de la radiación β .

4.8.2 Lipogénesis en adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

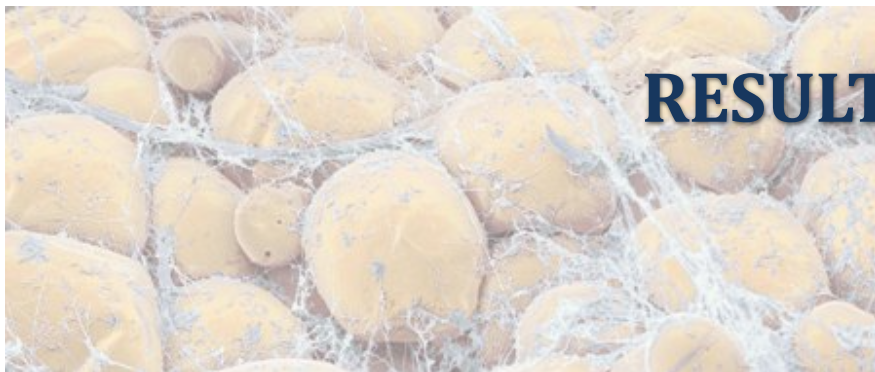
Se estimularon adipocitos, previamente diferenciados (sección 4.1.1.b) y sembrados en placas de 24 pocillos, con los reactivos descritos en 4.7. Se incubaron las células en medio OM-BM, durante 15 min en atmósfera de a 37 °C, atmósfera O₂/CO₂ de 95/5 % y 96 % de humedad. Seguidamente se añadieron 0,05 μ Ci de acetato sódico 16 mM. Tras 2 h, se paró la reacción en hielo y lavando las células dos veces con PBS. Se recogieron los adipocitos en un vial de contaje añadiendo 500 μ l de NaOH 1 N y levantándolos con raspadores. Se añadieron 4 ml de líquido de centelleo y se dejaron reposar 1 h a TA. Por último, se realizó el contaje de radiación β .

4.9 Análisis estadístico de los resultados.

Materiales

- Programa informático SPSS, *IBM* (Armonk, EE.UU.)

Todos los resultados fueron analizados con el programa estadístico Statistical Package for the Social Science (SPSS versión 21.0). La significancia estadística de los incrementos se valoró mediante el análisis de la varianza de un sólo factor (ANOVA). De acuerdo al test de Levene, se determinó la homogeneidad de las varianzas de las muestras y seguidamente se realizó el test de Bonferroni para comparar las medias de los datos. Los resultados se expresan como el valor medio de la muestra \pm el error estándar de la media (EEM)



RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Expresión del receptor BRS-3 en el tejido adiposo de modelos animales y humanos con alteraciones metabólicas.

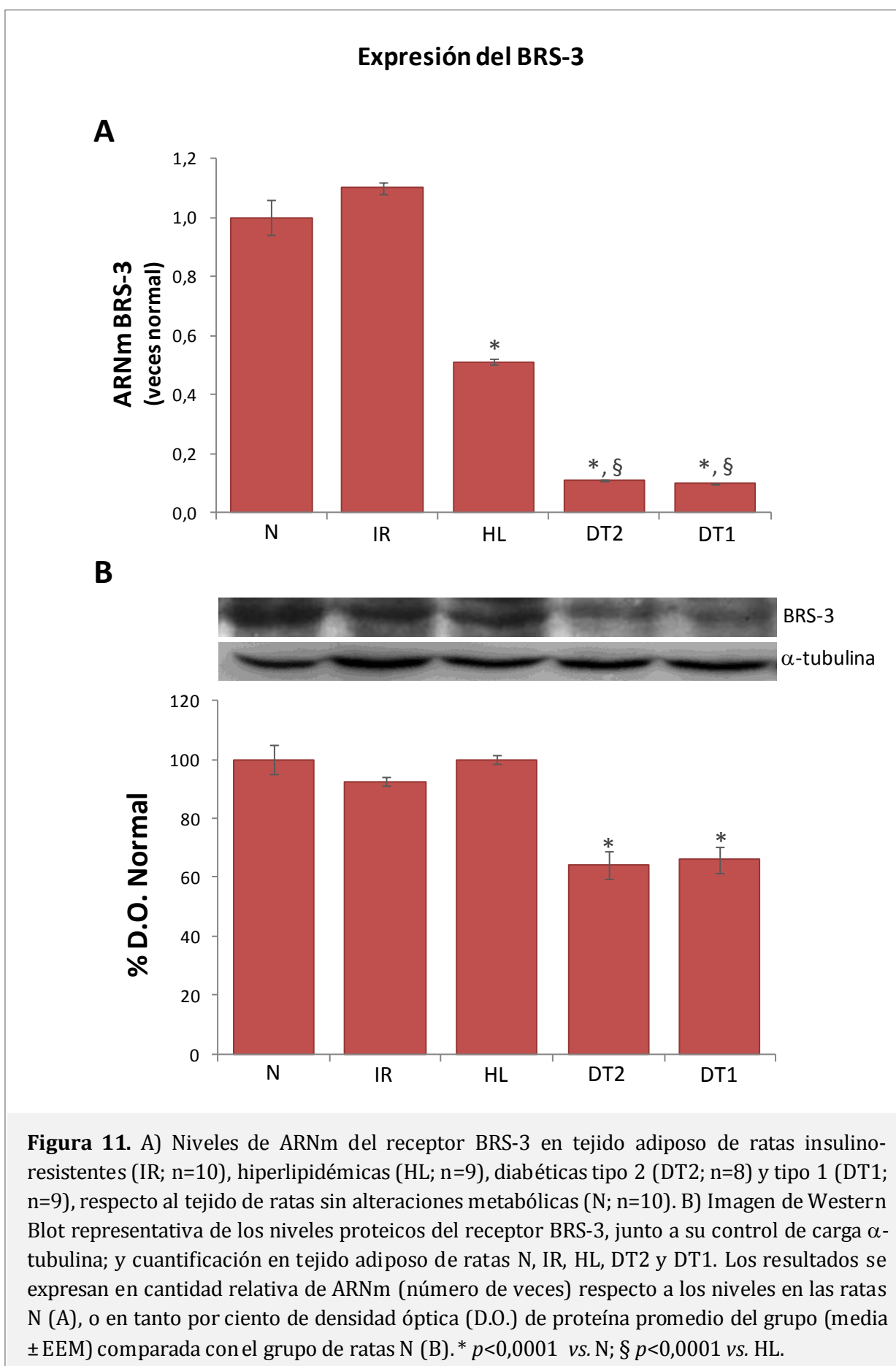
Estudios previos han descrito disminuciones en la expresión génica y proteica del receptor BRS-3, en tejido muscular esquelético de pacientes con alteraciones metabólicas.

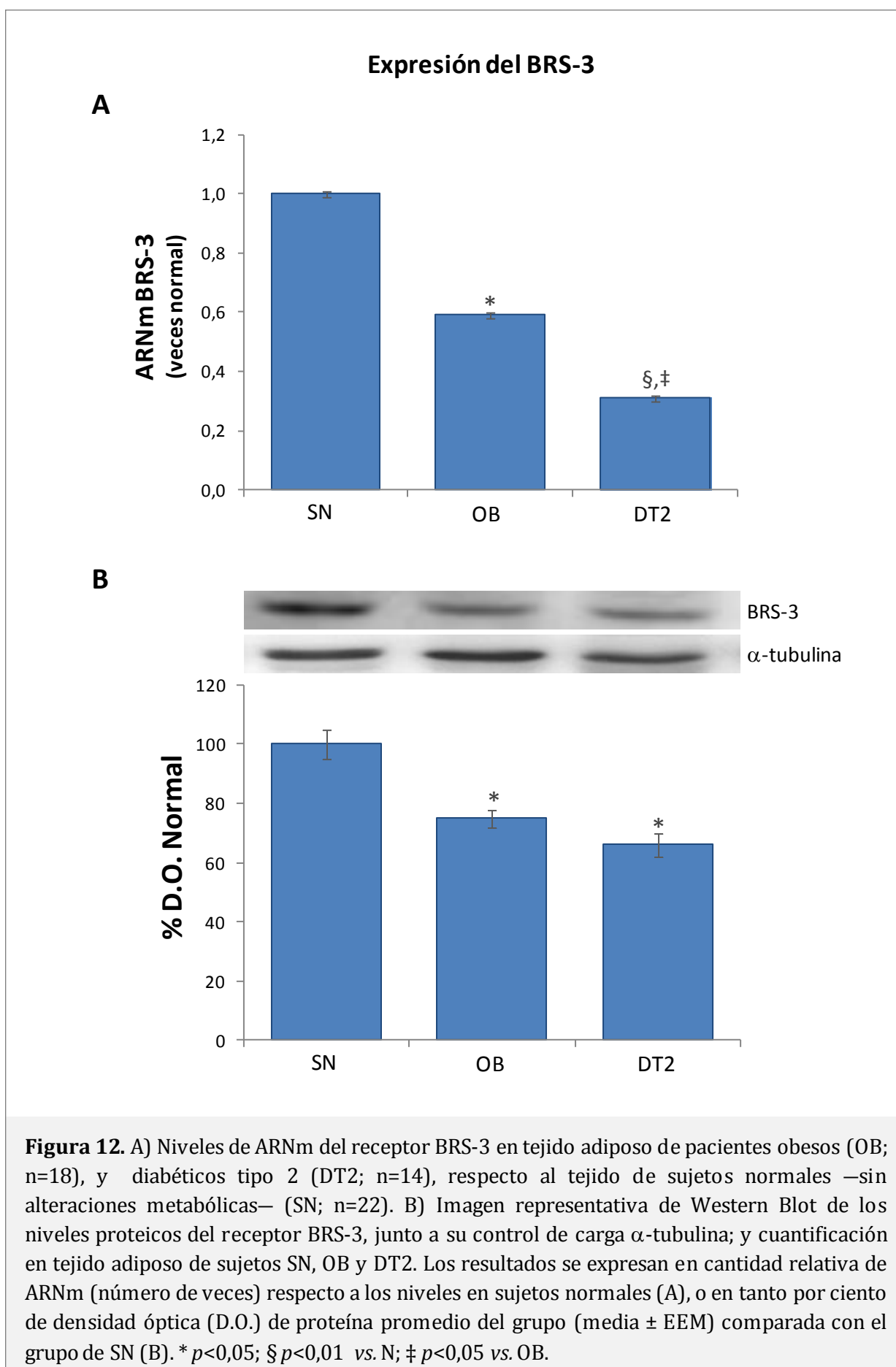
Debido a ello se comenzó este estudio analizando los niveles de expresión del BRS-3 en piezas de tejido adiposo epididimario de diferentes modelos animales de rata: IR, HL, DT2 y DT1, y se compararon con aquellos obtenidos en ratas sin alteraciones metabólicas –N–. El mismo análisis se llevó a cabo en el tejido adiposo visceral obtenido de pacientes OB y DT2, en relación a sujetos sin alteraciones metabólicas –SN–. Las características de los pacientes incluidos en el estudio se recogen en la Tabla 3, como previamente se ha descrito en el apartado 4.1.2.a de la sección Material y Métodos.

Los niveles de ARNm del receptor (Figura 11 A) en el tejido adiposo de ratas IR (IR: $1,10 \pm 0,02$ veces más que N) fueron similares a los del grupo sin alteraciones metabólicas ($1,00 \pm 0,02$). En cambio, en el modelo animal de HL se observó una disminución significativa en la expresión génica del BRS-3 ($1,96 \pm 0,03$ veces menos que N, $p < 0,0001$), así como en el tejido adiposo de los animales diabéticos, donde la reducción fue más acentuada. En ambos estadios, diabetes tipo 2 y 1, los niveles de ARNm fueron similares (DT2: $10,34 \pm 0,36$ veces menos que N, $p < 0,0001$; DT1: $9,65 \pm 0,23$ veces menos que N, $p < 0,0001$) y menores ($p < 0,05$) a los hallados en el modelo de HL.

A nivel proteico (Figura 11 B), no se encontraron diferencias en la expresión del BRS-3 en las piezas de tejido adiposo de los modelos animales de IR ni HL respecto de las ratas N (IR: 93 ± 2 % Normal; HL: 100 ± 1 % Normal); únicamente los grupos de ratas diabéticas presentaron reducciones significativas (DT2: 64 ± 4 % Normal; DT1: 66 ± 5 % Normal; $p < 0,0001$).

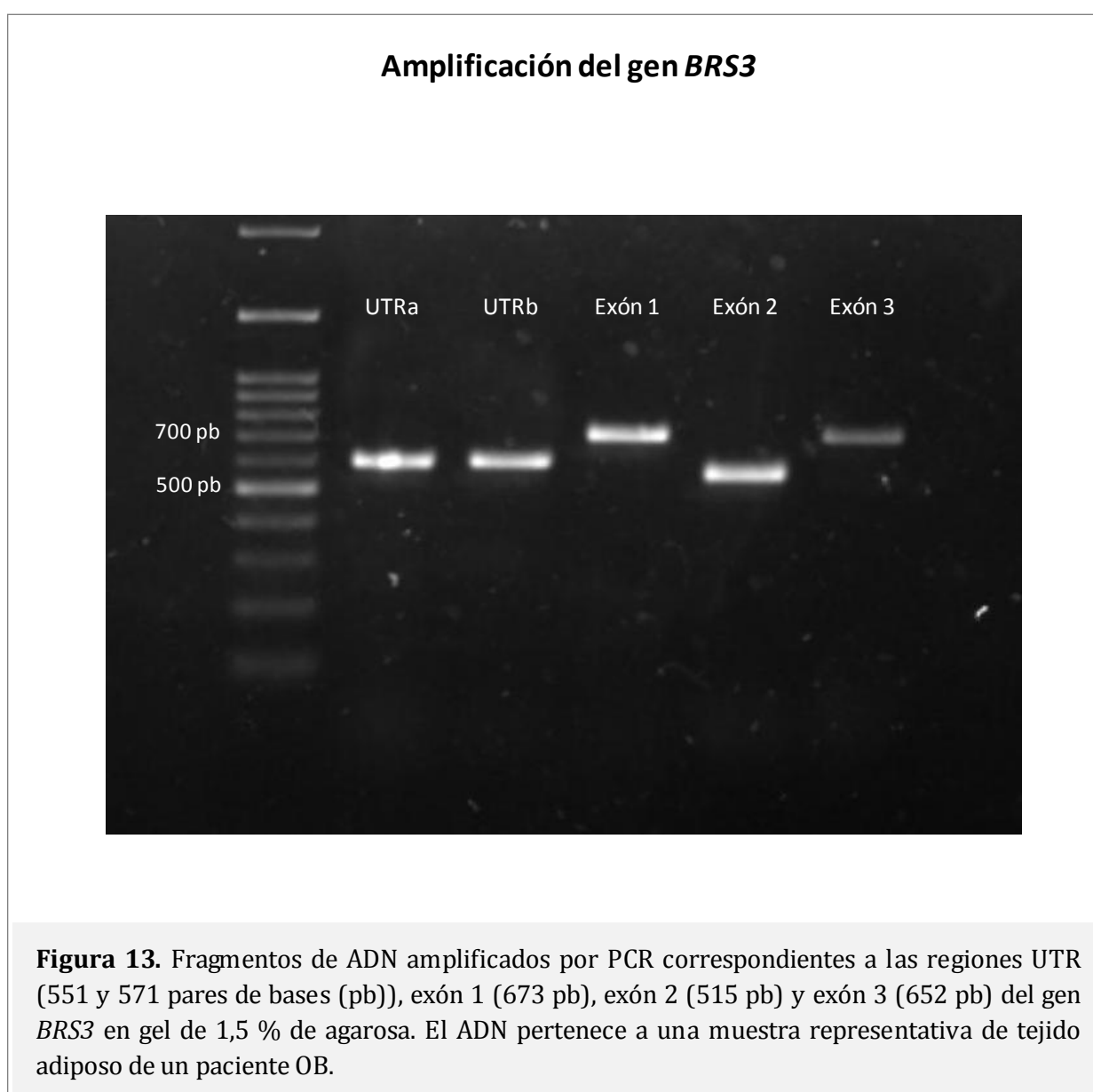
En humanos, los niveles de ARNm del BRS-3 (Figura 12 A) se encontraron significativamente reducidos en el tejido adiposo, tanto de los pacientes obesos como de los diabéticos (OB: $1,68 \pm 0,03$ veces menos que SN, $p < 0,05$; DT2: $3,21 \pm 0,10$ veces menos que SN, $p < 0,01$), respecto a los sujetos sin alteraciones metabólicas ($1,00 \pm 0,01$). La disminución de la expresión génica observada en pacientes diabéticos, fue más acusada que en los pacientes obesos, alcanzando significancia estadística ($p < 0,05$). A nivel proteico (Figura 12 B), también se detectaron niveles del BRS-3 reducidos significativamente ($p < 0,05$) en el tejido adiposo de los pacientes con alteraciones metabólicas (OB: 75 ± 3 % SN; DT2: 66 ± 4 % SN) respecto al grupo de SN (100 ± 5).





5.2 Secuenciación del gen para el receptor BRS-3 en el tejido adiposo de pacientes con alteraciones metabólicas.

Se secuenciaron las regiones 5'UTR (en dos amplicones, a y b) y los 3 exones del gen *BRS3*, en el ADN genómico aislado de tejido adiposo procedente de 124 pacientes con alteraciones metabólicas: OB (n= 66) y DT2 (n= 58). En ninguno de los dos grupos, se detectaron mutaciones ni polimorfismos en la región estudiada del gen *BRS3*; las secuencias no presentaron variaciones respecto a aquella de referencia. En la Figura 13 se muestra la separación de fragmentos previamente amplificados por PCR de las distintas regiones secuenciadas, correspondientes a una muestra representativa de tejido graso de un paciente obeso.



5.3 Efectos del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,NI¹⁴]Bn₆₋₁₄ en la expresión del receptor BRS-3 en los adipocitos de rata y humano.

Se realizaron estudios sobre los efectos del agonista del receptor BRS-3 en la modulación de la expresión, tanto génica como proteica, del BRS-3.

Para ello se incubaron adipocitos aislados de grasa epididimaria de rata y diferenciados de línea celular de humano –ambos tipos celulares sin alteraciones metabólicas– en presencia del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,NI¹⁴]Bn₆₋₁₄, el cual aumentó significativamente los niveles de ARNm del receptor de forma dosis-dependiente, tanto en células de rata como en las de humano.

Específicamente en rata (Figura 14 A), el agonista a 10⁻¹⁰ M mostró una tendencia a aumentar los niveles de ARNm del receptor (1,45 ± 0,08 veces control). A partir de 10⁻⁹ M, el ligando provocó un aumento significativo ($p < 0,001$) en la expresión génica del BRS-3 (2,20 ± 0,13 veces control, $p < 0,001$), equiparable al generado por la insulina a la misma concentración (2,05 ± 0,19 veces control, $p < 0,001$). Este incremento, fue significativamente menor que el inducido por el agonista a concentración de 10⁻⁸ M (3,77 ± 0,28 veces control, $p < 0,001$).

El aumento observado en células humanas (Figura 14 B) fue significativo respecto al control (10⁻⁹ M: 2,06±0,11 veces control, 10⁻⁸ M: 3,17±0,52 veces control, $p < 0,05$); no obstante, y al igual que en rata, este aumento en la expresión génica, fue significativamente mayor que el inducido por la insulina (1,41 ± 0,19 veces control, $p < 0,05$).

Asimismo, se evaluó mediante microscopía confocal (Figura 15), el efecto del agonista en los adipocitos de rata. Los resultados mostraron un aumento de la presencia del receptor en la membrana plasmática en las células, estimuladas por el ligando sintético o por la insulina, comparadas con las aquellas que no recibieron estímulo. Al igual que a nivel génico, se observó que la inducción generada tanto por la insulina como por el agonista a 10⁻⁹ M eran similares *de visu*, mientras que la localización del receptor en membrana resultó notablemente superior si era originada por el agonista a 10⁻⁸ M.

5.4 Efecto del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ en la activación de las enzimas de señalización intracelular.

La activación del receptor BRS-3 se estudió mediante la presencia de su agonista y las rutas de señalización intracelulares desencadenadas en adipocitos aislados de grasa epididimaria de rata y diferenciados de línea celular de humano, ambos tipos celulares sin alteraciones metabólicas.

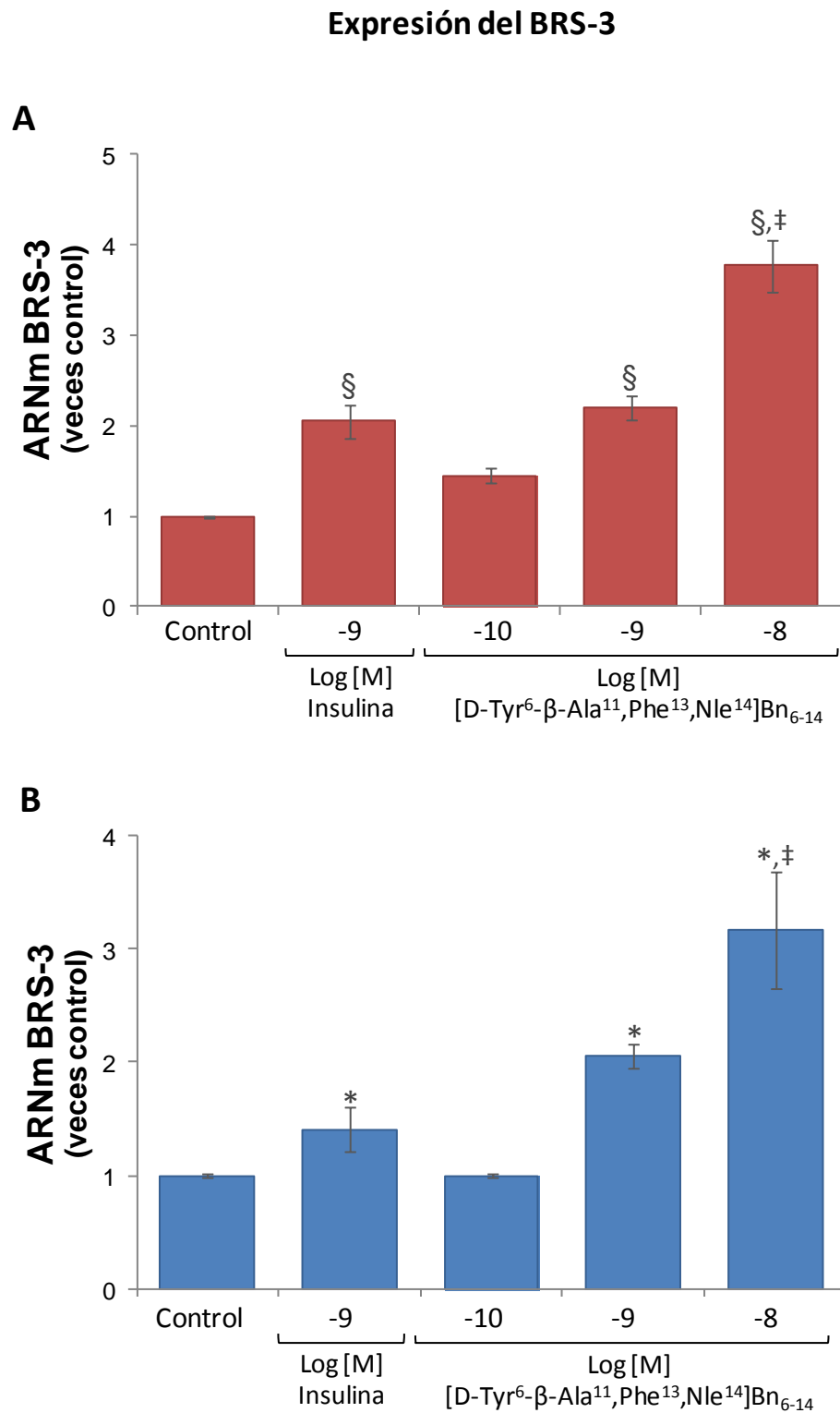


Figura 14. Cantidad relativa (número de veces) de ARNm del receptor BRS-3 (media±EEM), en adipocitos aislados de grasa epididimaria de rata (A; n=4) y diferenciados de línea celular de humano (B; n=4), sin alteraciones metabólicas, en respuesta a la incubación durante 1 h en presencia o ausencia del agonista [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ o insulina. * $p<0,05$; § $p<0,001$ vs. control y ‡ $p<0,05$ vs. insulina.

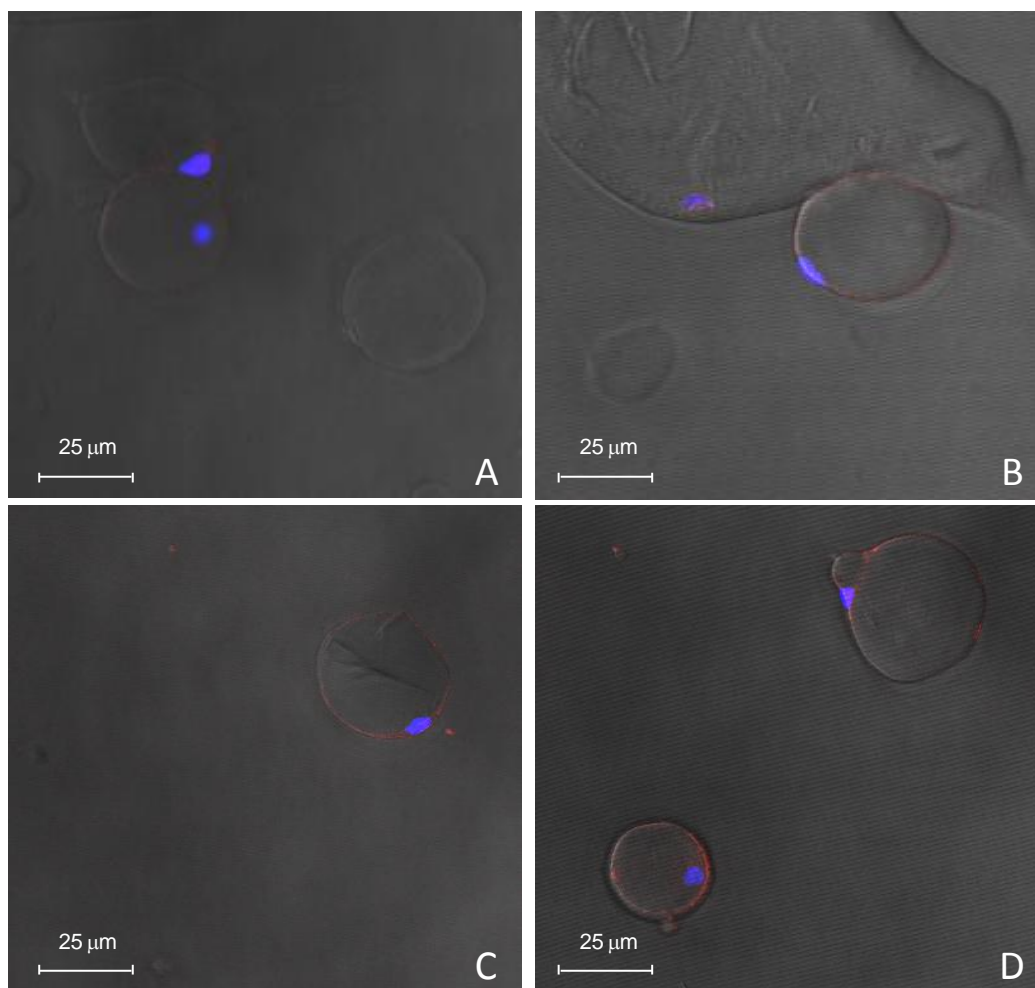
Expresión del BRS-3

Figura 15. Imágenes de microscopía confocal (objetivo 40X) de adipocitos aislados de rata sin alteraciones metabólicas, tras incubación de 1 h en ausencia (A) o presencia del agonista [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄, a 10⁻⁹ M (B) o 10⁻⁸ M (C), o insulina 10⁻⁹ M (D). Se observa sobre una imagen de contraste de fase, el receptor BRS-3 (rojo) en la membrana plasmática de los adipocitos y los núcleos de las células teñidos con DAPI (azul).

Las rutas estudiadas fueron la vía de la PKB/mTOR, donde específicamente se analizó la fosforilación de las quinasas PKB y p70s6K, y la ruta de las MAPKs, dentro de las cuales se examinaron las MAPKs p42/44 y la enzima p90 RSK-1.

5.4.1 Fosforilación de las enzimas en los adipocitos aislados de rata.

Globalmente en los adipocitos aislados de rata, el agonista del receptor BRS-3 causó un aumento en la fosforilación de las quinasas, respecto a los niveles basales de la misma.

5.4.1.a PKB

En la Figura 16 A se representa el efecto del ligando sintético sobre la fosforilación de la PKB. El compuesto a 10^{-10} M mostró una tendencia a aumentar la fosforilación de la quinasa ($11 \pm 5 \% \Delta$ control), a pesar de que los resultados no alcanzaron significancia estadística respecto a los niveles detectados en los adipocitos incubados sin estímulo. Sin embargo, el agonista a mayores concentraciones, aumentó de manera significativa la fosforilación de la enzima (10^{-9} M: $34 \pm 5 \% \Delta$ control, $p < 0,001$; 10^{-8} M: $33 \pm 5 \% \Delta$ control, $p < 0,02$), al igual que la insulina (10^{-9} M: $44 \pm 11 \% \Delta$ control, $p < 0,02$).

5.4.1.b p70s6K

El ligando sintético, a concentración de 10^{-10} M ($10 \pm 3 \% \Delta$ control), no generó diferencias significativas en los niveles basales de fosforilación de la p70s6K (Figura 16 B). No obstante, a concentraciones superiores del agonista se detectaron elevaciones significativas de la fosforilación de la quinasa respecto del control (10^{-9} M: $56 \pm 9 \% \Delta$ control, $p < 0,001$; 10^{-8} M: $61 \pm 12 \% \Delta$ control, $p < 0,001$), alcanzando los mismos niveles que aquellos inducidos por la insulina a concentración fisiológica (10^{-9} M: $56 \pm 20 \% \Delta$ control, $p < 0,05$).

5.4.1.c p42/44 MAPKs

En la Figura 17 A se describe el efecto del agonista del BRS-3, sobre la fosforilación de las MAPKs p42/p44. A 10^{-10} M, el compuesto indujo un leve aumento de la fosforilación de las MAPKs (p42: $13 \pm 3 \% \Delta$ control; p44: $14 \pm 3 \% \Delta$ control), aunque no alcanzó significancia estadística respecto de las células sin estímulo. Sin embargo, cuando los adipocitos fueron incubados a 10^{-9} y a 10^{-8} M, los niveles de fosforilación de MAPKs aumentaron respecto del control, siendo similares en ambas enzimas (10^{-9} M: p42: $37 \pm 3 \% \Delta$ control; p44: $39 \pm 5 \% \Delta$ control, $p < 0,01$; 10^{-8} M: p42: $41 \pm 4 \% \Delta$ control, $p < 0,05$; p44: $48 \pm 7 \% \Delta$ control, $p < 0,01$); al igual que los generados por la insulina (p42: $38 \pm 5 \% \Delta$ control,

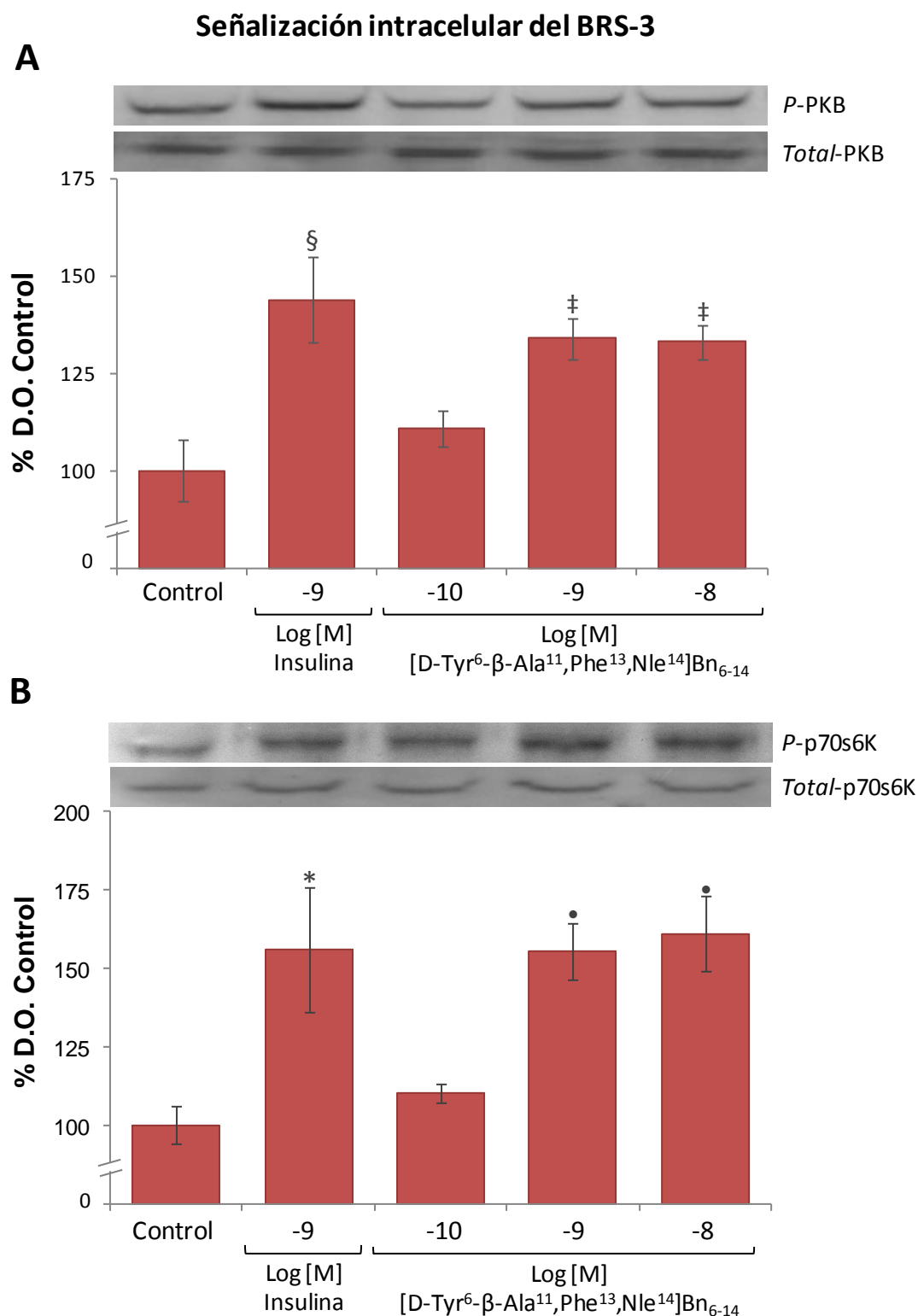


Figura 16. Efecto del agonista [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ en la fosforilación de las quinasas PKB (A) y p70s6K (B) en adipocitos aislados de grasa epididimaria de rata sin alteraciones metabólicas (n=6). Imagen representativa de Western Blot de la fosforilación de las quinasas junto a la proteína total; y cuantificación expresada en porcentaje de densidad óptica (D.O.) de proteína promedio del grupo respecto al control (media ± EEM). * $p < 0,05$; § $p < 0,02$; ‡ $p < 0,01$; • $p < 0,001$ vs. control.

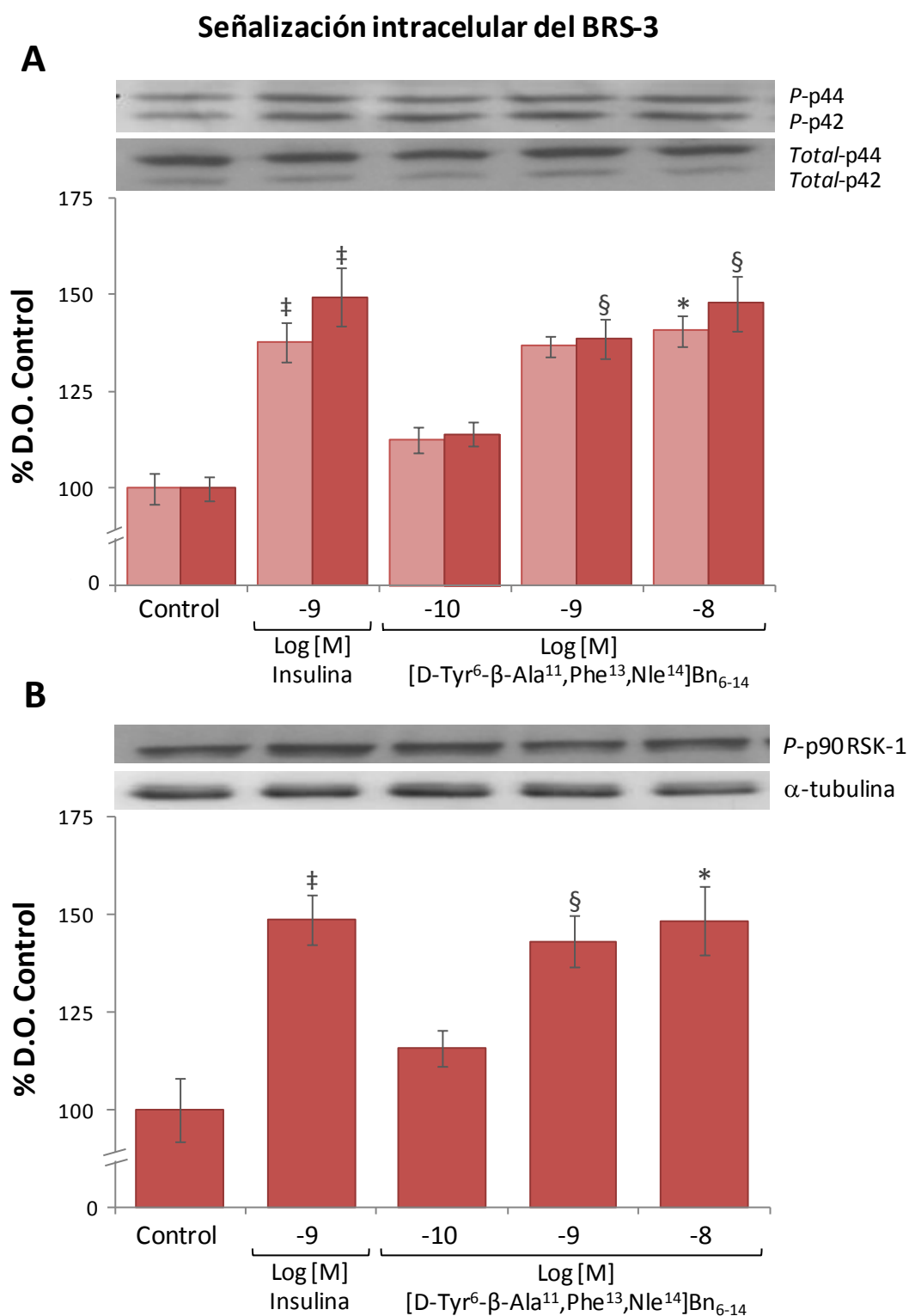


Figura 17. Efecto del agonista [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ en la fosforilación de (A) las MAPKs p42 (■) y p44 (■) y (B) de la p90 RSK-1 en adipocitos aislados de rata sin alteraciones metabólicas (n=10). Imagen representativa de Western Blot de la fosforilación de la quinasa junto a su control de carga; y cuantificación expresada en porcentaje de densidad óptica (D.O.) de proteína promedio del grupo respecto al control (media ± EEM). * $p < 0,05$; § $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$ vs. control.

$p < 0,001$; p44: $49 \pm 7 \% \Delta$ control, $p < 0,001$).

5.4.1.d p90 RSK-1

El agonista a 10^{-10} M (Figura 17 B) mostró un leve aumento en la fosforilación de la p90 RSK-1 ($16 \pm 5 \% \Delta$ control), no significativo respecto a los niveles basales de fosforilación de la quinasa. A concentraciones superiores del agonista, se detectó la máxima estimulación de la fosforilación de la enzima (10^{-9} M: $43 \pm 6 \% \Delta$ control, $p < 0,01$; 10^{-8} M: $48 \pm 9 \% \Delta$ control, $p < 0,05$), siendo el efecto similar a aquel ejercido por la insulina ($49 \pm 7 \% \Delta$ control, $p < 0,001$).

5.4.2 Fosforilación de las enzimas en los adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

Paralelamente, se llevaron a cabo los estudios de fosforilación de las quinasas de señalización intracelular en adipocitos diferenciados de línea celular de humano.

5.4.2.a PKB

En la Figura 18 A, se representa el efecto del ligando sobre la fosforilación de la PKB. A concentración de 10^{-10} M ($8 \pm 5 \% \Delta$ control), el compuesto no modificó el nivel basal de fosforilación de la quinasa. Sin embargo, la presencia del agonista del BRS-3 a 10^{-9} y 10^{-8} M indujo un incremento significativo en los niveles de enzima fosforilada, (10^{-9} M: $40 \pm 5 \% \Delta$ control, $p < 0,05$; 10^{-8} M: $44 \pm 11 \% \Delta$ control, $p < 0,001$), similares a los generados por la insulina ($64 \pm 4 \% \Delta$ control, $p < 0,001$).

5.4.2.b p70s6K

La estimulación de los adipocitos de humano (Figura 18 B) con el agonista del BRS-3 a 10^{-10} M ($18 \pm 4 \% \Delta$ control), mostró tendencia a elevar los niveles basales de la fosforilación de la p70s6K. Sin embargo, cuando las células se incubaron en presencia del agonista tanto a 10^{-9} M como a 10^{-8} M, la fosforilación de la quinasa se vio incrementada de forma significativa (10^{-9} M: $32 \pm 5 \% \Delta$ control, $p < 0,001$; 10^{-8} M: $47 \pm 12 \% \Delta$ control, $p < 0,05$); respuesta similar a la inducida por la insulina ($50 \pm 12 \% \Delta$ control, $p < 0,05$).

5.4.2.c p42/44 MAPKs

En la Figura 19 A se representa el efecto que provocó el agonista del BRS-3 sobre la fosforilación de las MAPKs p42/p44. El agonista, a partir de 10^{-10} M, indujo un aumento significativo en la fosforilación de la MAPK p44 (10^{-10} M: $16 \pm 5 \% \Delta$ control; 10^{-9} M: 32 ± 10

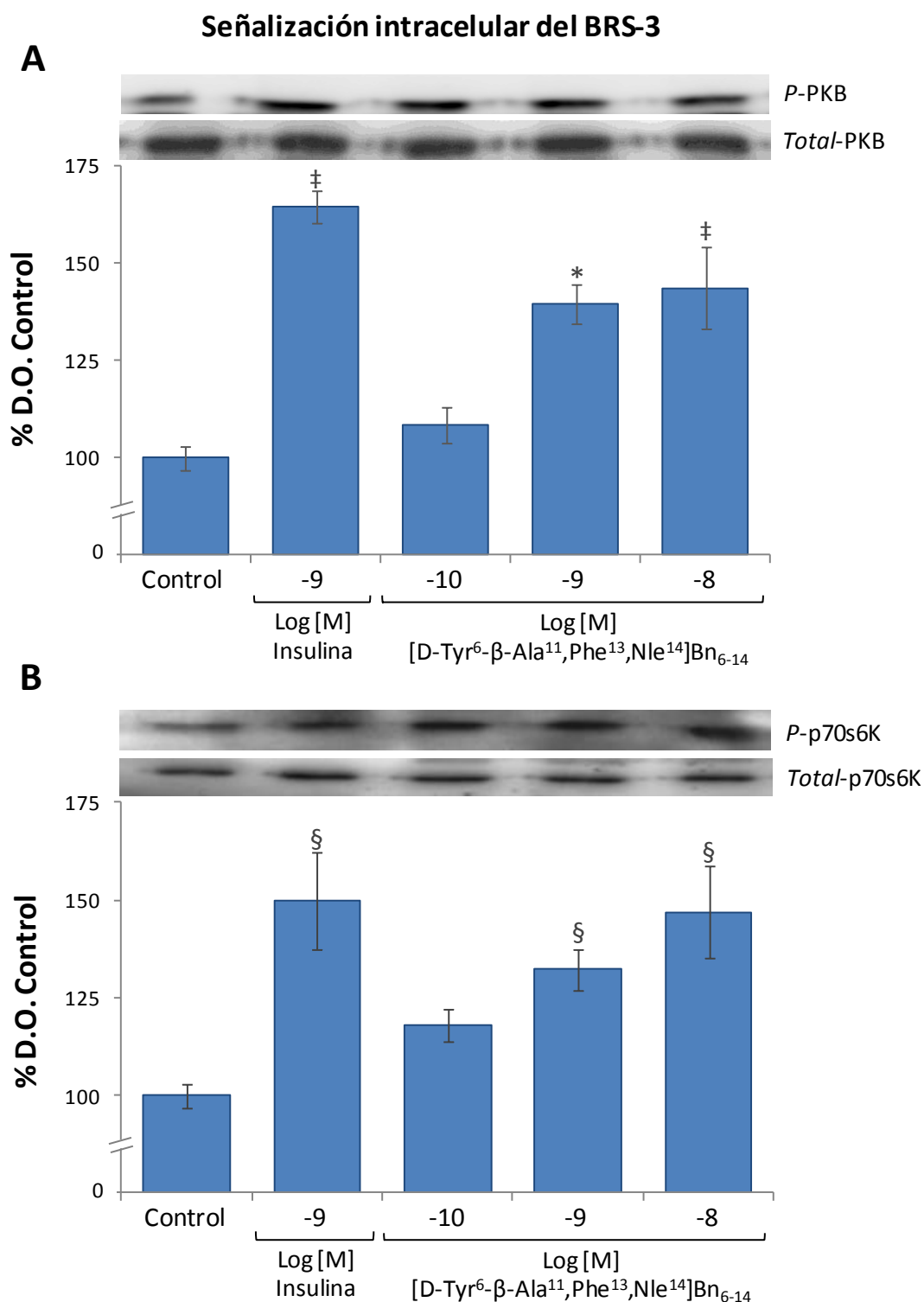


Figura 18. Efecto del agonista [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ en la fosforilación de las quinasas PKB (A) y p70s6K (B) en adipocitos diferenciados de línea celular humana sin alteraciones metabólicas (n=4). Imagen representativa de Western Blot de la fosforilación de las quinasas junto a la proteína total; y cuantificación expresada en porcentaje de densidad óptica (D.O.) de proteína promedio del grupo respecto al control (media ± EEM). * $p < 0,05$; § $p < 0,01$; ‡ $p < 0,001$ vs. control.

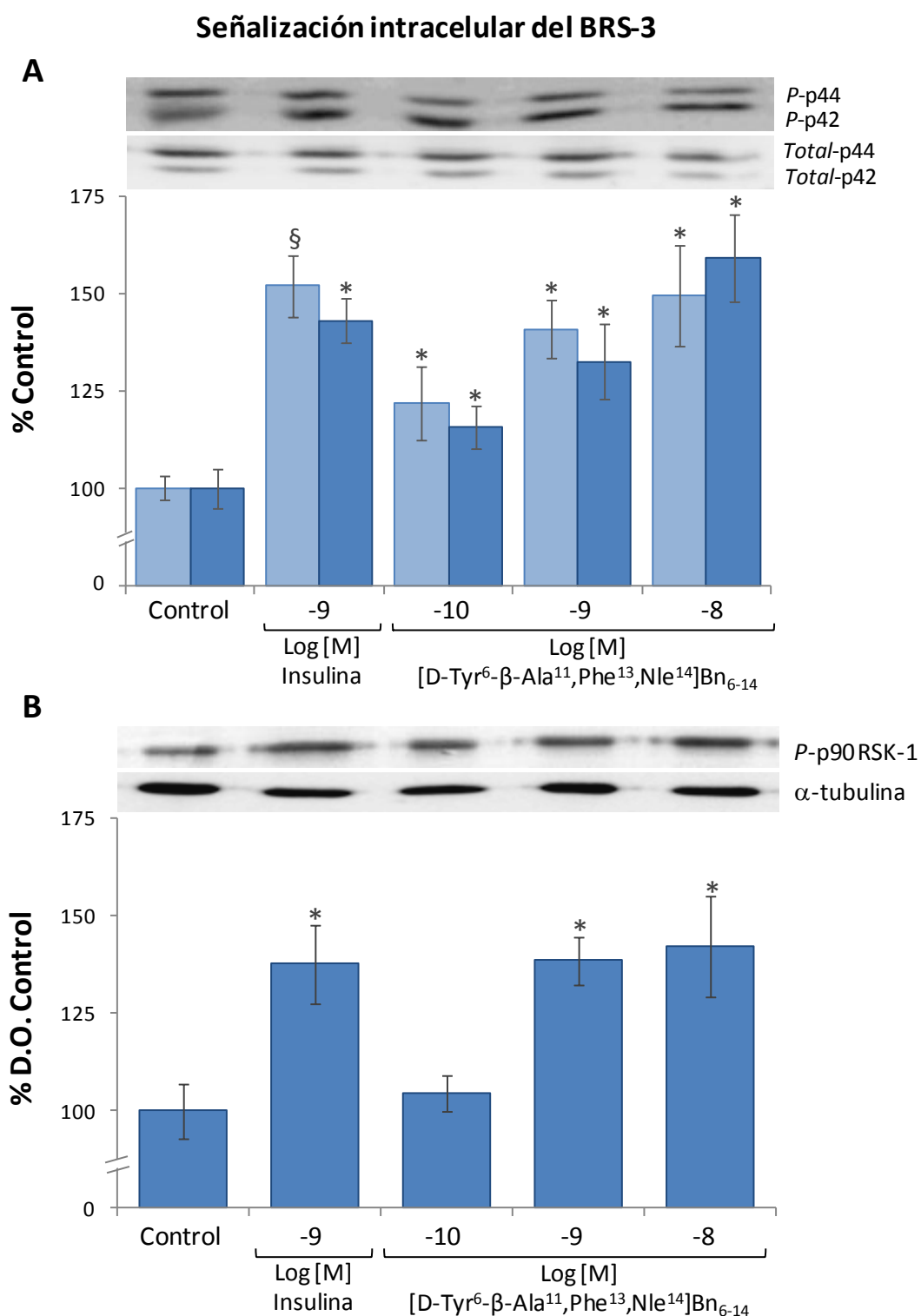


Figura 19. Efecto del agonista [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ en la fosforilación de (A) las MAP quinasas p42 (■) y p44 (■) y (B) de la p90 RSK-1 en adipocitos diferenciados de línea celular humana sin alteraciones metabólicas (n=4). Imagen representativa de Western Blot de la fosforilación de la quinasa junto a su control de carga; y cuantificación expresada en porcentaje de densidad óptica (D.O.) de proteína promedio del grupo respecto al control (media ± EEM). * $p < 0,01$; § $p < 0,001$ vs. control.

% Δ control), llegando a producir valores máximos de fosforilación a 10^{-8} M (59 ± 11 % Δ control). La insulina, también generó máximos niveles de fosforilación para la quinasa (43 ± 6 % Δ control, $p < 0,01$).

De manera análoga a la enzima p44, al incubar los adipocitos humanos con el ligando sintético también se detectó un incremento significativo ($p < 0,01$) en los niveles de la MAPK p42 fosforilada, aumentando en función de la concentración el estímulo (10^{-10} M: 22 ± 9 % Δ control; 10^{-9} M: 41 ± 7 % Δ control, $p < 0,01$). El máximo efecto fue inducido tanto por el agonista a 10^{-8} M, como por la insulina a concentración fisiológica (10^{-8} M: 49 ± 13 % Δ control, $p < 0,01$; insulina: 52 ± 8 % Δ control, $p < 0,001$).

5.4.2.d p90 RSK-1

En la figura 19 B, se observa el efecto que mostró el agonista del receptor BRS-3 sobre la fosforilación de la p90 RSK-1 en los adipocitos de humano. La estimulación con el agonista a 10^{-10} M (4 ± 7 % Δ control), no produjo diferencias en los niveles de fosforilación de la quinasa, respecto de los detectados en aquellas células sin estímulo. Sin embargo, la presencia del ligando sintético a partir de 10^{-9} M, provocó una estimulación significativa de la enzima (10^{-9} M: 38 ± 6 % Δ control, $p < 0,01$; 10^{-8} M: 42 ± 13 % Δ control, $p < 0,01$), de igual magnitud que la inducida por el control positivo (insulina: 38 ± 10 % Δ control).

5.5 Efecto del [D-Tyr⁶, β -Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ sobre el Glut-4 y el transporte de glucosa.

Uno de los parámetros fundamentales en el metabolismo celular de la glucosa, es la presencia del glucotransportador Glut-4 en la capa externa de la membrana plasmática. En este estudio se determinó el efecto que ejercía el agonista del receptor BRS-3 sobre la expresión del glucotransportador, así como de su translocación a la membrana plasmática. Adicionalmente, se analizaron los efectos del agonista a nivel celular en el transporte de la glucosa. Ambos parámetros se estudiaron en las células adiposas de las especies estudiadas en presencia o ausencia del ligando sintético del receptor BRS-3.

5.5.1 Efecto del [D-Tyr⁶, β -Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ sobre la expresión del Glut-4 y su localización en la membrana plasmática.

Inicialmente, se evaluaron los efectos que ejerció el ligando sintético del receptor BRS-3 sobre la expresión génica del Glut-4.

En los adipocitos de rata (Figura 20 A), se detectó un aumento significativo ($p<0,05$) en los niveles de ARNm del glucotransportador a concentración 10^{-9} M tanto del agonista como de la insulina (agonista: $1,99 \pm 0,11$ veces control; insulina: $2,00 \pm 0,41$ veces control); El ligando a 10^{-8} M, también indujo un incremento en la expresión génica ($1,74 \pm 0,06$ veces control), a pesar de no alcanzar significancia estadística.

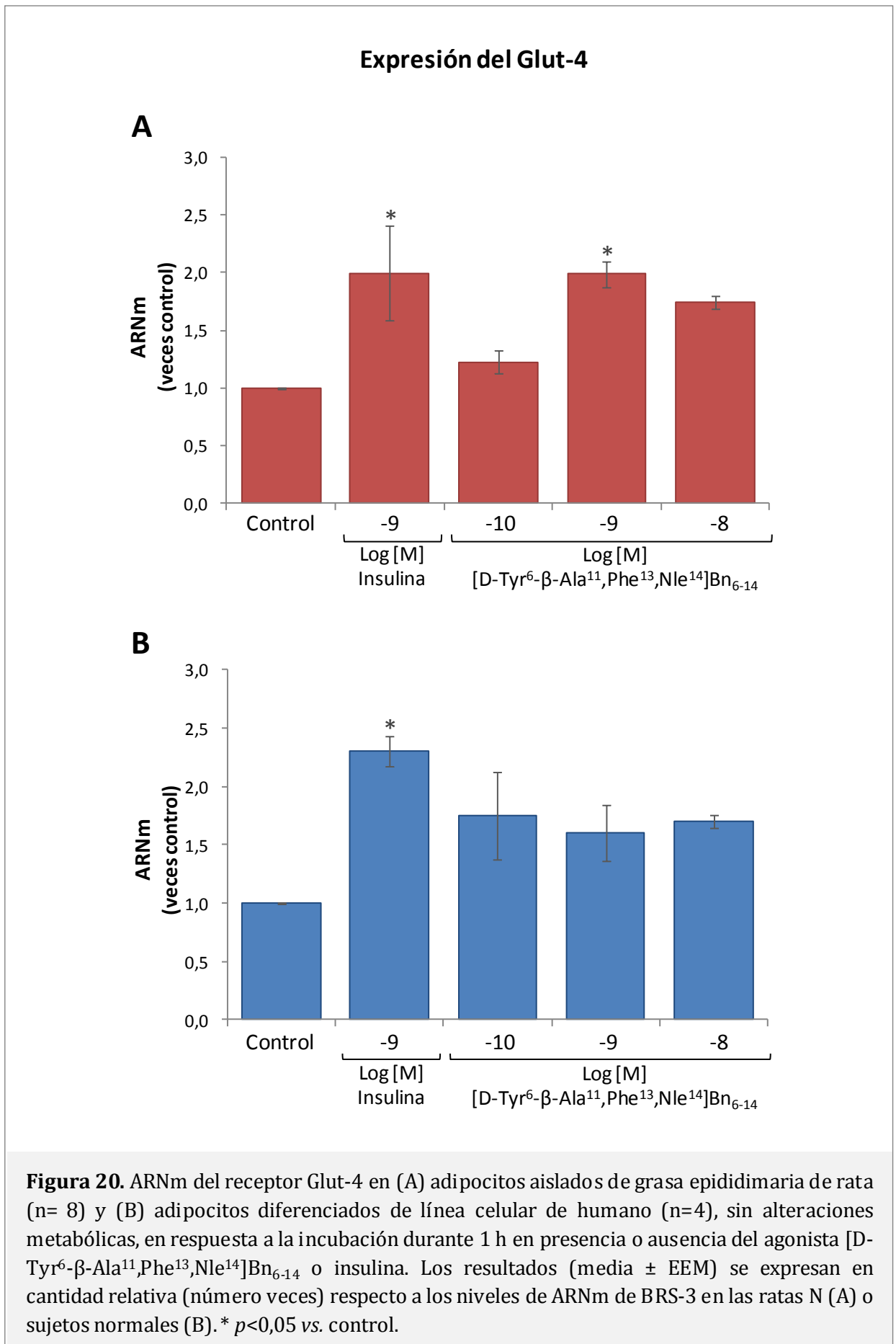
Del mismo modo, en los adipocitos diferenciados de humano (Figura 20 B) el agonista mostró una tendencia a elevar los niveles de mensajero del Glut-4, pero sin representar diferencias significativas respecto del control (10^{-10} M: $1,75 \pm 0,38$ veces control, 10^{-9} M: $1,60 \pm 0,24$ veces control, 10^{-8} M: $1,70 \pm 0,06$ veces control). Al igual que en las células de rata, la insulina a 10^{-9} M aumentó significativamente los niveles de ARNm ($2,30 \pm 0,13$ veces control, $p<0,05$).

De manera adicional, se evaluaron los efectos del agonista del BRS-3 sobre la presencia del Glut-4 en la membrana plasmática de los adipocitos aislados de rata (Figura 21). Se detectó que a partir de 10^{-9} M, el ligando aumentaba de manera significativa la translocación del Glut-4 a la membrana plasmática (10^{-9} M: $39 \pm 7 \Delta \%$ control, $p<0,001$; 10^{-8} M: $42 \pm 6 \Delta \%$ control, $p<0,05$), respecto de las células sin estimular; al igual que la insulina a concentración fisiológica (10^{-9} M: $52 \pm 8 \Delta \%$ control, $p<0,001$).

5.5.2 Efecto del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,NI¹⁴]Bn₆₋₁₄ sobre el transporte de glucosa.

De manera complementaria a la presencia del glucotransportador en la membrana plasmática, se analizaron los efectos del agonista en el proceso del transporte de glucosa celular.

Concretamente, cuando los adipocitos aislados de rata son incubados en presencia de concentraciones crecientes de [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,NI¹⁴]Bn₆₋₁₄, se observó que este compuesto estimulaba el transporte de la glucosa respecto a los niveles basales y lo hacía de manera dosis-dependiente (Figura 22). Los resultados están expresados en fentomoles de glucosa tritiada incorporados por cada 100.000 células. La presencia del ligando a la concentración mínima testada, es decir 10^{-11} M, no produjo efecto en el transporte de la hexosa ($3,27 \pm 0,22$ fmol glucosa/ 10^5 células) comparando con la incorporación basal de las células de 2-deoxi-D- [1,2-³H(N)] glucosa ($3,07 \pm 0,41$ fmol glucosa/ 10^5 células). Se detectó un ligero aumento en el transporte del azúcar con el ligando a 10^{-10} M ($3,91 \pm 0,22$ fmol glucosa/ 10^5 células) aunque sin representar una significancia respecto del control. Sin embargo, la incorporación del tritio fue máxima cuando las células fueron estimuladas con el agonista del BRS-3 a 10^{-9} M, incorporando $4,80 \pm 0,13$ fmol glucosa/ 10^5 células ($p<0,001$); este incremento significativo se mantuvo a



Expresión del Glut-4

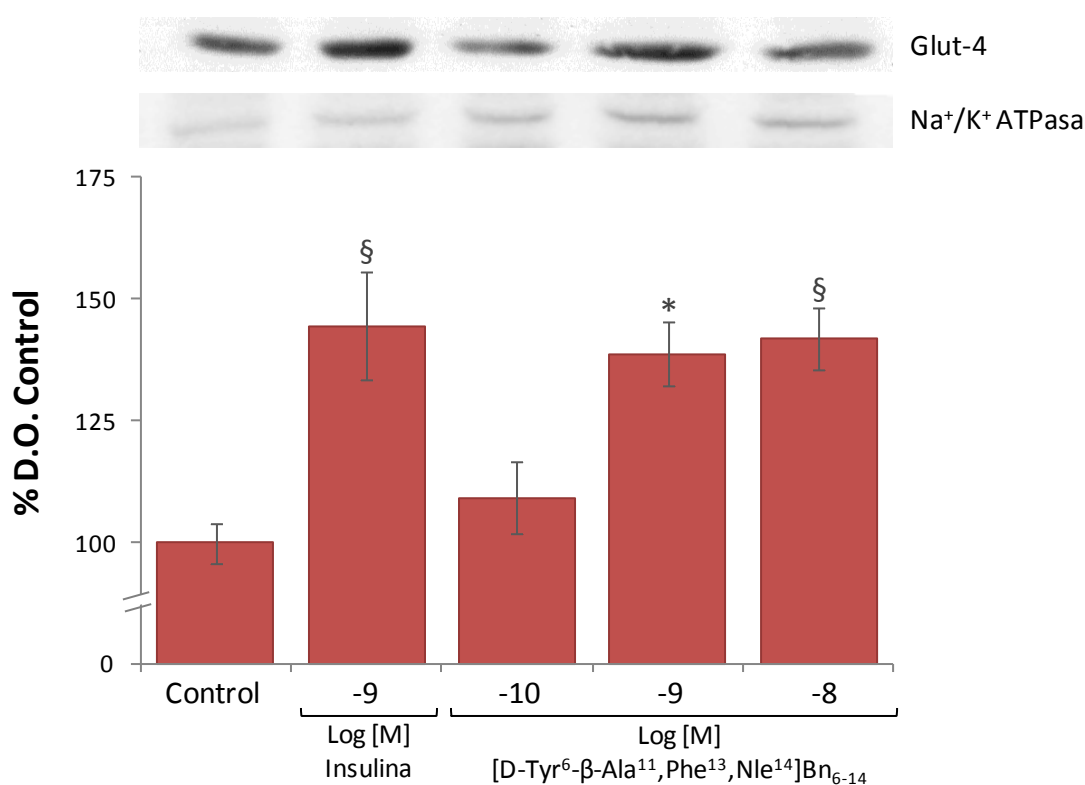
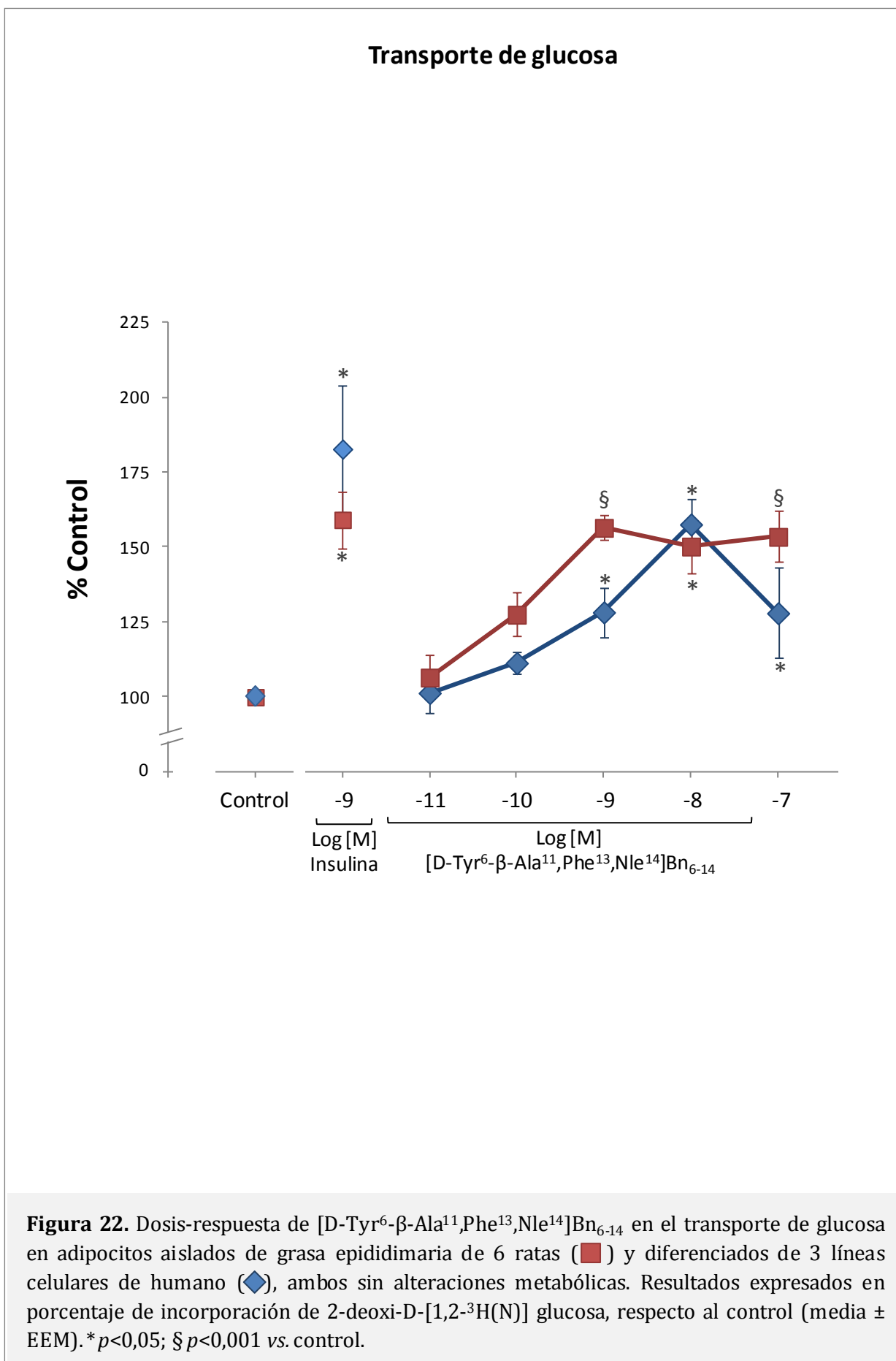


Figura 21. Imagen representativa de Glut-4 en la membrana plasmática de adipocitos aislados de rata (n=4), sin alteraciones metabólicas, junto a su control de carga Na⁺/K⁺ ATPasa, tras 1 h de incubación en presencia o ausencia del agonista [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ o insulina; y cuantificación expresada en porcentaje de densidad óptica (D.O.) de proteína promedio del grupo respecto al control (media ± EEM). * $p < 0,001$; § $p < 0,0001$ vs. control.



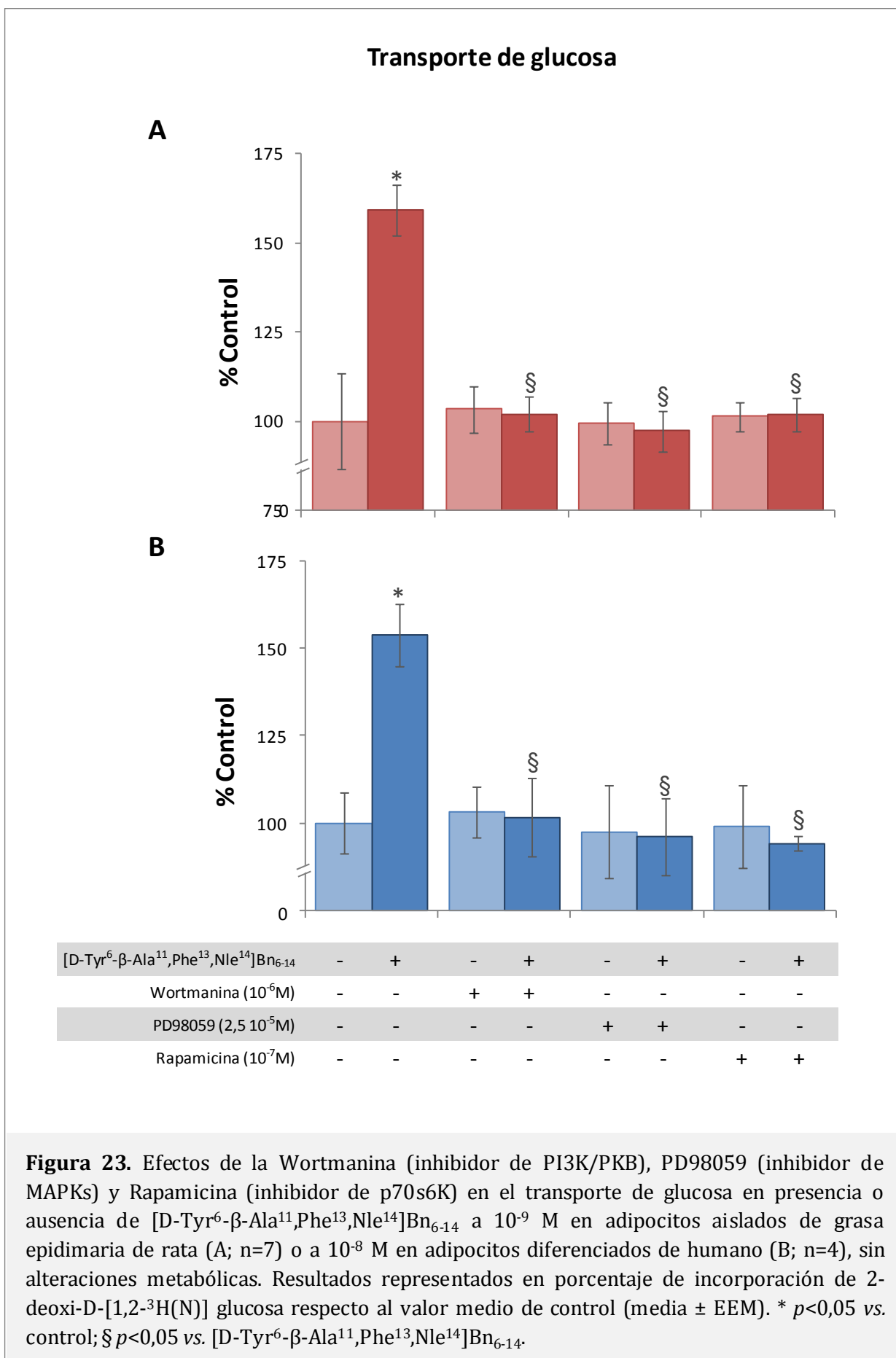
concentraciones crecientes del ligando (10^{-8} M: $4,61 \pm 0,73$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$; 10^{-7} M: $4,70 \pm 0,23$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,001$). Mismos niveles de incorporación fueron detectados por la presencia de la insulina a 10^{-9} M ($4,80 \pm 0,13$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,001$).

Resultados análogos se obtuvieron en los adipocitos diferenciados de humano (Figura 22). En este tipo celular, el agonista a 10^{-11} M, no produjo efecto alguno ($4,70 \pm 0,32$ fmol glucosa/ 10^5 células) sobre el transporte basal de la glucosa ($4,64 \pm 0,40$ fmol glucosa/ 10^5 células); sin embargo, a 10^{-10} M se detectó un ligero aumento que no alcanzó significancia estadística ($5,16 \pm 0,17$ fmol glucosa/ 10^5 células). A concentraciones superiores del compuesto se estimuló de manera significativa ($p < 0,05$) la incorporación del azúcar, alcanzando su máximo efecto a 10^{-8} M y permaneciendo estable a 10^{-7} M (10^{-9} M: $6,22 \pm 0,34$ fmol glucosa/ 10^5 células; 10^{-8} M: $7,13 \pm 0,42$ fmol glucosa/ 10^5 células; 10^{-7} M: $5,93 \pm 0,70$), al igual que se detectó en presencia de la insulina (10^{-9} M: $8,47 \pm 0,99$ fmol glucosa/ 10^5 células).

Por otro lado, se investigaron las vías de señalización intracelulares involucradas en el proceso del transporte de la glucosa, estimulado por [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄. Para ello se emplearon inhibidores —Wortmanina, PD98059 y Rapamicina— de diferentes quinasas, las cuales se ha visto con anterioridad aumentaban sus niveles de fosforilación mediante el agonista del receptor BRS-3.

En los adipocitos aislados de rata (Figura 23 A), el incremento en el transporte de glucosa inducido por el ligando sintético del BRS-3 a 10^{-9} M ($5,74 \pm 0,25$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control) fue completamente abolido en presencia de los inhibidores de las quinasas (Wortmanina + agonista: $3,68 \pm 0,17$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. agonista; PD98059 + agonista: $3,50 \pm 0,20$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. agonista; Rapamicina + agonista: $3,67 \pm 0,17$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. agonista); revirtiendo a los niveles basales de incorporación de glucosa tritiada que presentaron las células sin estímulos ($3,60 \pm 0,60$ fmol glucosa/ 10^5 células). La única presencia de los inhibidores no alteró los niveles basales de transporte del azúcar (Wortmanina: $3,72 \pm 0,23$ fmol glucosa/ 10^5 células; PD98059: $3,58 \pm 0,15$ fmol glucosa/ 10^5 células y Rapamicina: $3,65 \pm 0,15$ fmol glucosa/ 10^5 células).

Del mismo modo que lo observado en las células murinas, en los adipocitos humanos (Figura 23 B) el aumento significativo del transporte de la hexosa estimulado por la presencia del agonista a 10^{-8} M ($7,13 \pm 0,42$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control) respecto a los niveles basales ($4,64 \pm 0,40$ fmol glucosa/ 10^5 células), quedó completamente anulado en presencia de los inhibidores de las enzimas (Wortmanina + agonista: $5,10 \pm 0,56$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. agonista; PD98059 + agonista: $4,46 \pm 0,51$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. agonista; Rapamicina + agonista: $4,36 \pm 0,10$ fmol glucosa/ 10^5 células,



$p < 0,05$ vs. agonista). Cuando las células fueron incubadas en solitario con los inhibidores de las quinasas, los niveles de incorporación no difirieron de los basales (Wortmanina: $4,79 \pm 0,33$ fmol glucosa/ 10^5 células; PD98059: $4,52 \pm 0,61$ fmol glucosa/ 10^5 células; Rapamicina: $4,59 \pm 0,55$ fmol glucosa/ 10^5 células).

5.6 Efecto del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ en el metabolismo de lípidos: lipogénesis.

En la fisiología de la célula adiposa, la lipogénesis constituye un proceso esencial. Debido a su importancia, se analizaron los efectos del agonista del receptor BRS-3 en dicho proceso, a través de la incorporación de acetato de sodio marcado con ¹⁴C. Paralelamente, se estudiaron las vías de señalización implicadas en el proceso lipogénico mediante el empleo de inhibidores de diferentes quinasas de señalización, concretamente Wortmanina, PD98059 y Rapamicina.

Específicamente, cuando los adipocitos de grasa epididimaria de rata, fueron incubados en presencia de concentraciones ascendentes del ligando sintético del receptor, se observó que la tasa lipogénica aumentaba de manera creciente con la dosis del compuesto (Figura 24). Este efecto comenzó a observarse a partir de 10^{-12} M, encontrando una ligera tendencia al incremento de la incorporación del acetato marcado, a pesar de no suponer una diferencia significativa respecto de las células sin estimular (Control: $0,991 \pm 0,008$ nmol ¹⁴C/ 10^5 células; 10^{-12} M: $1,066 \pm 0,044$ nmol ¹⁴C/ 10^5 células; 10^{-11} M: $1,123 \pm 0,033$ nmol ¹⁴C/ 10^5 células; 10^{-10} M: $1,203 \pm 0,037$ nmol ¹⁴C/ 10^5 células). A partir de 10^{-9} M, el agonista del BRS-3 aumentó significativamente el proceso de lipogénesis respecto del control, alcanzando su máximo efecto a 10^{-7} M (10^{-9} M: $1,298 \pm 0,031$ nmol ¹⁴C / 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control; 10^{-8} M: $1,398 \pm 0,078$ nmol ¹⁴C / 10^5 células, $p < 0,001$ vs. control; 10^{-7} M: $1,532 \pm 0,121$ nmol ¹⁴C / 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control). La estimulación con insulina, elevó de manera significativa el nivel de incorporación de ¹⁴C respecto de los basales ($1,399 \pm 0,032$ nmol ¹⁴C / 10^5 células, $p < 0,001$ vs. control), siendo la magnitud similar a la inducida por la misma concentración del ligando.

Al igual que en las células de rata, los adipocitos diferenciados de línea celular humana en presencia del agonista del receptor BRS-3, aumentaron la tasa lipogénica conforme se incrementó la concentración del compuesto (Figura 24). De este modo, el ligando sintético a partir de 10^{-11} M, elevó la incorporación de ¹⁴C, la cual no representó significancia estadística respecto al control ($2,074 \pm 0,378$ nmol ¹⁴C / 10^5 células) hasta 10^{-9} M (10^{-12} M: $2,074 \pm 0,104$ nmol ¹⁴C / 10^5 células; 10^{-11} M: $2,120 \pm 0,316$ nmol ¹⁴C / 10^5 células; 10^{-10} M: $2,688 \pm 0,126$ nmol ¹⁴C / 10^5 células; 10^{-9} M: $3,035 \pm 0,187$ nmol ¹⁴C / 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control). A concentraciones mayores del agonista el efecto se sostuvo (10^{-8} M: $3,280 \pm 0,306$ nmol ¹⁴C / 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control; 10^{-7} M: $3,284 \pm 0,101$ nmol ¹⁴C/ 10^5 células, $p < 0,001$ vs. control). La insulina a concentración fisiológica, causó la

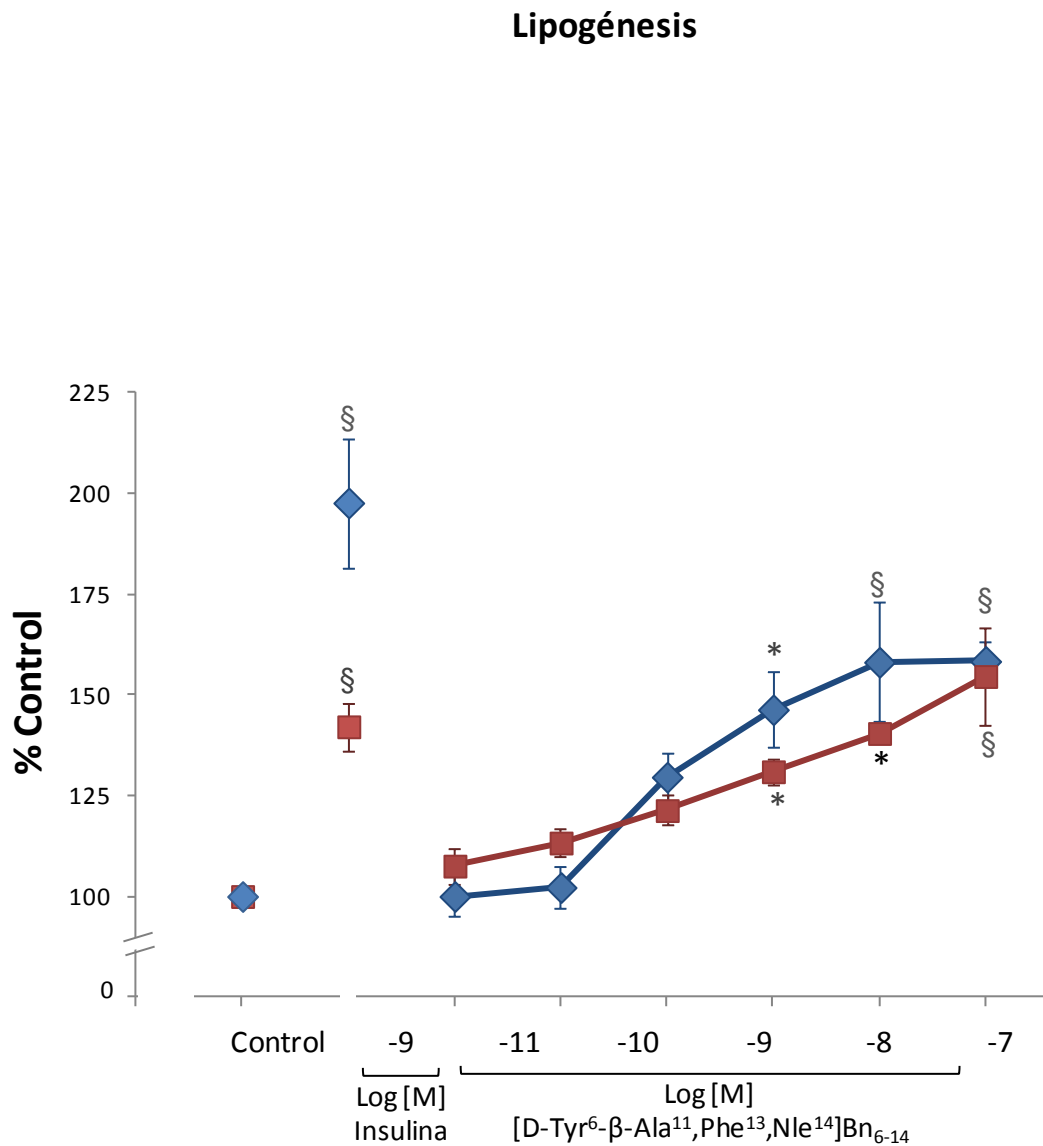


Figura 24. Efecto lipogénico dosis-dependiente de [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ en adipocitos aislados de rata (■; n=7) y diferenciados de línea celular de humano (◆; n=3), ambos sin alteraciones metabólicas. Resultados (media ± EEM) expresados en porcentaje de incorporación de acetato de sodio marcado con ¹⁴C respecto al control. * $p < 0,05$; § $p < 0,001$ vs. control.

mayor incorporación de acetato marcado ($4,107 \pm 0,333$ nmol ^{14}C / 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control).

Adicionalmente, se analizaron las quinasas de señalización involucradas en el proceso lipogénico de los adipocitos, tanto de rata como de humano, para lo cual se emplearon los inhibidores Wortmanina, PD98059 y Rapamicina.

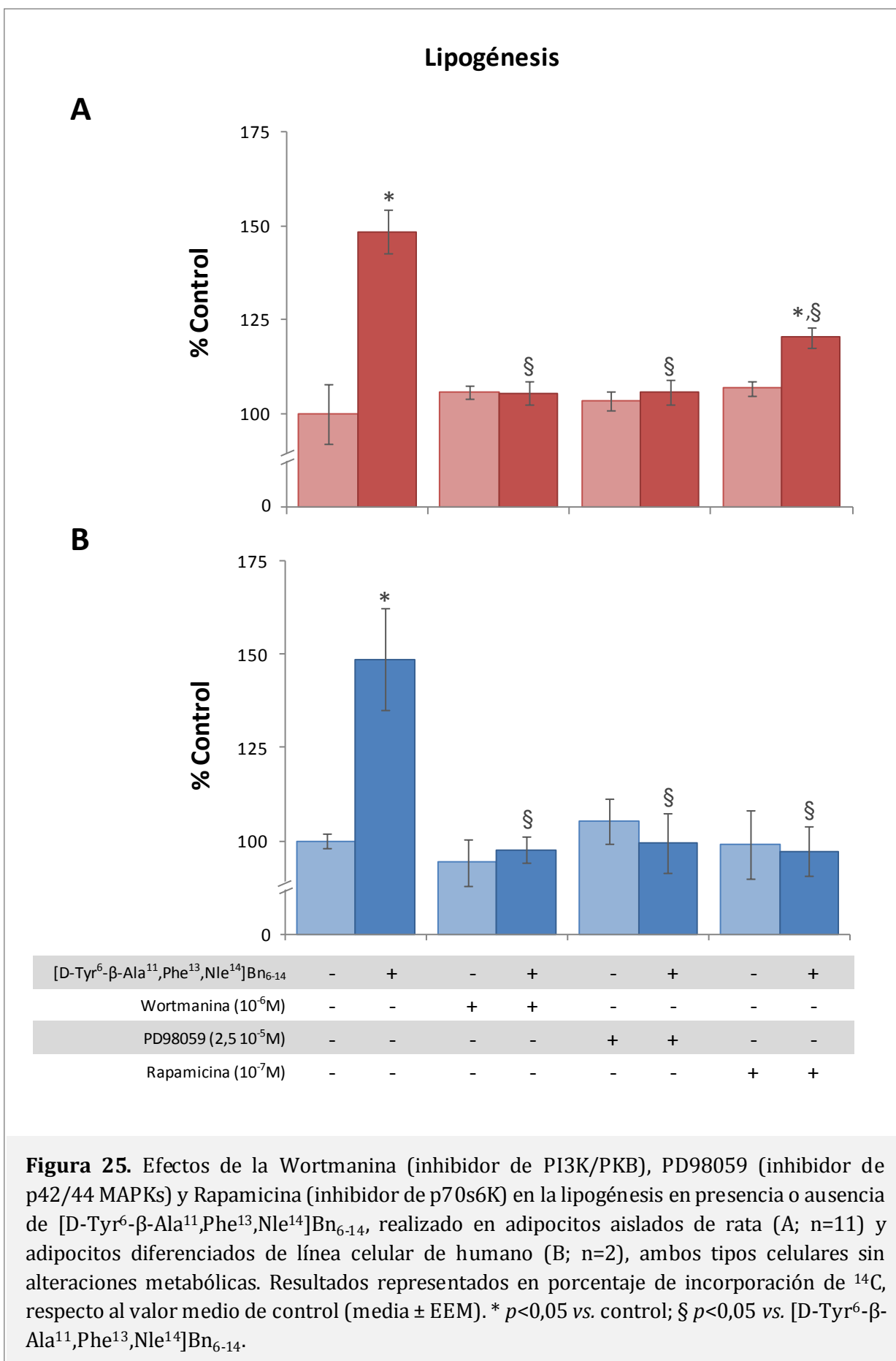
En las células adiposas animales, la presencia de los inhibidores Wortmanina y PD98059 (Figura 25 A), suprimió completamente la estimulación de la lipogénesis inducida por el agonista del BRS-3 (Wortmanina + agonista: $1,113 \pm 0,033$ nmol ^{14}C /10⁵ células, $p < 0,05$ vs. agonista; PD98059 + agonista: $1,116 \pm 0,035$ nmol ^{14}C /10⁵ células, $p < 0,05$ vs. agonista; agonista: $1,433 \pm 0,026$ nmol ^{14}C /10⁵ células, $p < 0,05$ vs. control), obteniendo valores basales de incorporación de acetato marcado (Control: $1,056 \pm 0,086$ nmol ^{14}C /10⁵ células).

No obstante, se observó que el inhibidor Rapamicina, disminuyó la magnitud del efecto lipogénico causado por el ligando (Rapamicina + agonista: $1,270 \pm 0,028$ nmol ^{14}C /10⁵ células, $p < 0,05$ vs. agonista), mostrando diferencias significativas respecto de los niveles de incorporación estimulados por el agonista, pero también respecto a los basales. Por otro lado, la incubación con los inhibidores separadamente, no produjo efecto alguno sobre la lipogénesis (Wortmanina: $1,115 \pm 0,018$ nmol ^{14}C /10⁵ células; PD98059: $1,091 \pm 0,027$ nmol ^{14}C /10⁵ células; Rapamicina: $1,127 \pm 0,020$ nmol ^{14}C /10⁵ células).

En los adipocitos de la línea celular de humano (Figura 25 B), se detectó que el aumento en la incorporación de ^{14}C estimulado por el agonista del BRS-3 ($3,104 \pm 0,306$ nmol ^{14}C /10⁵ células, $p < 0,05$ vs. control), se encontró completamente abolido por todos los compuestos bloqueantes (Wortmanina + agonista: $1,915 \pm 0,074$ nmol ^{14}C /10⁵ células, $p < 0,05$ vs. agonista; PD98059 + agonista: $1,952 \pm 0,166$ nmol ^{14}C /10⁵ células, $p < 0,05$ vs. agonista; Rapamicina + agonista: $1,909 \pm 0,140$ nmol ^{14}C /10⁵ células, $p < 0,05$ vs. agonista), sin diferir de las células sin estimular ($1,963 \pm 0,263$ nmol ^{14}C /10⁵ células). Cuando las células se incubaron en la única presencia de los inhibidores, éstos no mostraron efecto alguno, presentando valores que no difirieron de los niveles basales de lipogénesis (Wortmanina: $1,850 \pm 0,263$ nmol ^{14}C /10⁵ células; PD98059: $2,067 \pm 0,122$ nmol ^{14}C /10⁵ células; Rapamicina: $1,944 \pm 0,263$ nmol ^{14}C /10⁵ células).

5.7 Especificidad del ligando del receptor BRS-3.

Está descrito que el agonista universal [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄, es un ligando con elevada afinidad por el receptor BRS-3, aunque de baja selectividad, puesto que también presenta afinidad por los receptores homólogos GRPR y NMBR. Con el fin de documentar que los efectos observados en presencia del agonista provenían únicamente de la activación del receptor BRS-3, mediante el ligando sintético [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ y que dichos efectos no derivan de



la activación del GRPR o del NMBR, se analizó la respuesta de los adipocitos en el transporte de glucosa en presencia de los inhibidores ME y PD168568 diclorohidrato, que bloquean la acción de los receptores GRPR y NMBR, respectivamente.

En las células de rata (Figura 26 A), ambos inhibidores no modificaron la estimulación máxima del ligando en el transporte de glucosa (ME + agonista: $4,36 \pm 0,18$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control; PD168568 + agonista: $4,47 \pm 0,15$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control; agonista: $4,38 \pm 0,19$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control). La presencia de los inhibidores no alteró los valores de incorporación basales de la hexosa (ME: $2,82 \pm 0,14$ fmol glucosa/ 10^5 células; PD168568: $2,91 \pm 0,09$ fmol glucosa/ 10^5 células; Control: $2,71 \pm 0,37$ fmol glucosa/ 10^5 células).

Al igual que en el animal, en los adipocitos de línea celular humana (Figura 26 B), tanto el ME como el PD168568 diclorohidrato, no interfirieron en la estimulación inducida por el agonista del BRS-3 sobre el transporte de glucosa (ME + agonista: $7,05 \pm 0,24$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control; PD168568 + agonista: $6,32 \pm 0,48$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control; agonista: $6,71 \pm 0,58$ fmol glucosa/ 10^5 células). La incorporación basal de la glucosa tritiada ($4,16 \pm 0,38$ fmol glucosa/ 10^5 células) no fue diferente a la obtenida en las células incubadas individualmente con los inhibidores (ME: $3,88 \pm 0,18$ fmol glucosa/ 10^5 células; PD168568: $4,06 \pm 0,25$ fmol glucosa/ 10^5 células $p < 0,05$ vs. control).

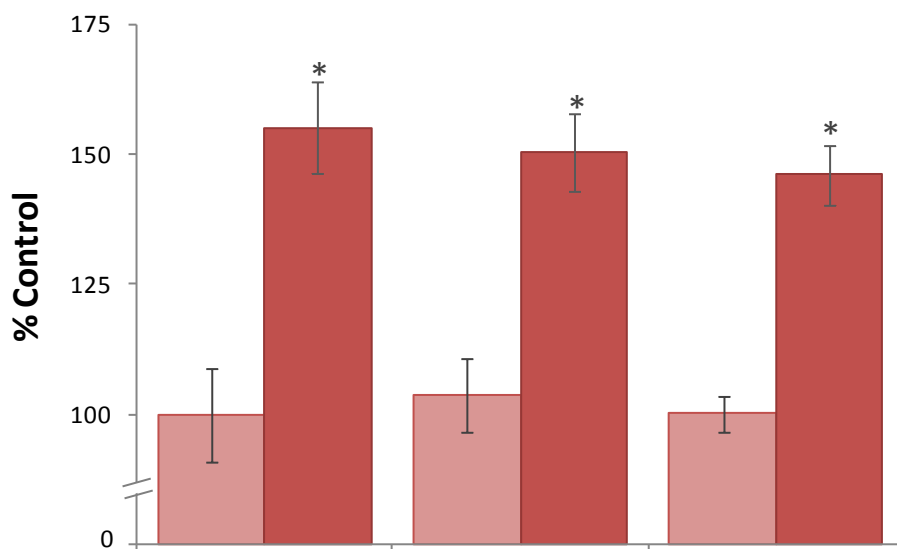
Además, en las células murinas, la presencia simultánea del ME y del PD168568 diclorohidrato (Figura 27), no causó alteraciones en el transporte de glucosa con respecto a las células estimuladas con el ligando (ME + PD168568 + agonista: $6,14 \pm 0,18$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control; agonista: $4,35 \pm 0,32$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control). La combinación de los inhibidores (ME + PD168568: $3,84 \pm 0,36$ fmol glucosa/ 10^5 células) no tuvo efecto alguno sobre el nivel basal de incorporación de hexosa ($3,88 \pm 0,16$ fmol glucosa/ 10^5 células).

Por último, con objeto de demostrar que los efectos inducidos por el [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄ son consecuencia exclusiva de la activación del receptor BRS-3, se estudió el transporte de la glucosa, empleando un antagonista, Bantag-1, del receptor.

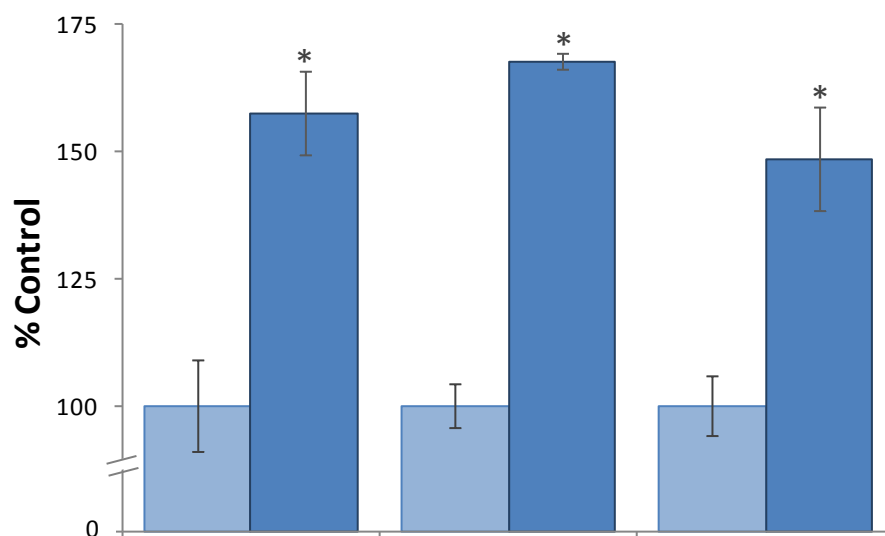
En las células animales (Figura 28 A), se detectó que la estimulación en la incorporación de hexosa tritiada causada por el ligando sintético a 10^{-9} M ($4,42 \pm 0,25$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control) resultaba totalmente inhibida por la presencia del compuesto antagonista ($3,36 \pm 0,19$ fmol glucosa/ 10^5 células), tornando a los niveles basales ($3,38 \pm 0,35$ fmol glucosa/ 10^5 células). Por otro lado, se observó que el Bantag-1 no ejerció efecto alguno sobre el transporte del azúcar ($3,13 \pm 0,18$ fmol glucosa/ 10^5 células).

Especificidad de los efectos del [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄

A



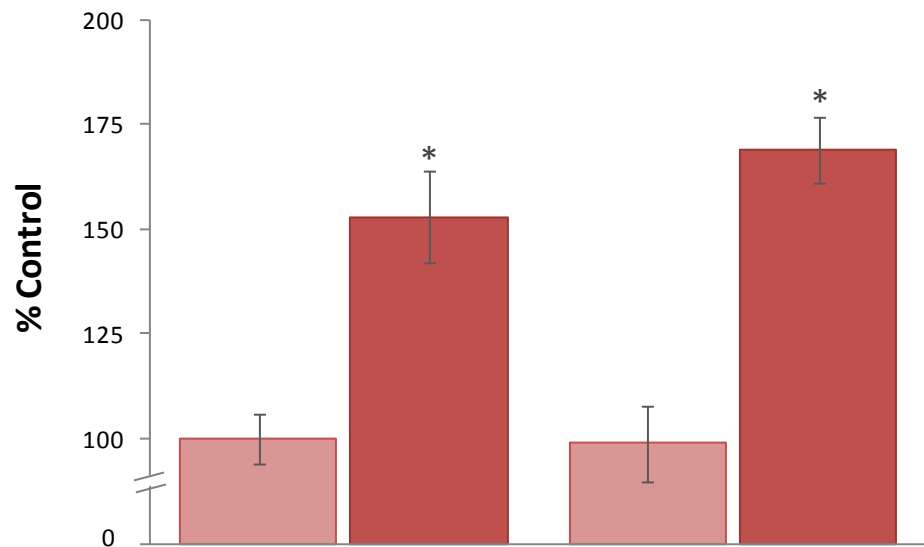
B



[D-Tyr ⁶ -β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄	-	+	-	+	-	+
[D-Phe ⁶]Bn ₆₋₁₄ metil éster	-	-	+	+	-	-
PD168568 diclorohidrato	-	-	-	-	+	+

Figura 26. Efectos de los inhibidores de GRPR ([D-Phe⁶]Bn₆₋₁₄ metil éster) y NMBR (PD168568 diclorohidrato) en el transporte de glucosa en adipocitos aislados de rata (A; n=6) o diferenciados de línea celular de humano (B; n= 2), ambos sin alteraciones metabólicas, en presencia o ausencia de [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄. Resultados (media ± EEM) representados en porcentaje de incorporación de ¹⁴C, respecto al valor medio de control. * *p*<0,05 vs. control.

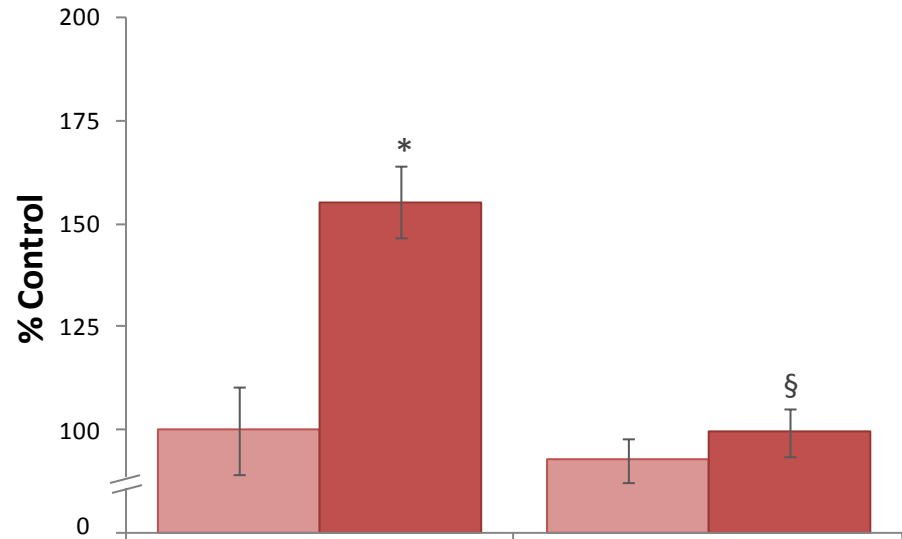
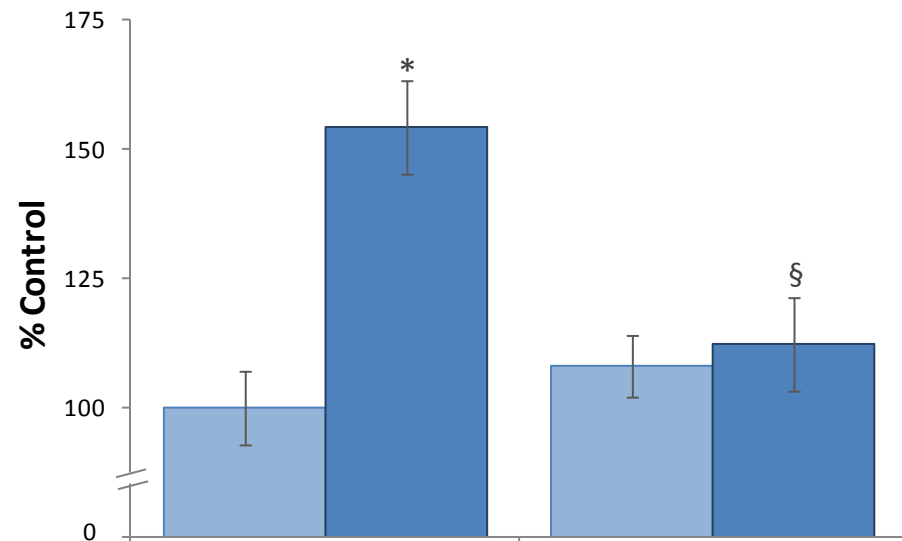
Especificidad de los efectos del [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄



[D-Tyr ⁶ -β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄	-	+	-	+
[D-Phe ⁶]Bn ₆₋₁₄ metil éster	-	-	+	+
PD168568 diclorohidrato	-	-	+	+

Figura 27. Efectos de la combinación de los inhibidores de GRPR ([D-Phe⁶]Bn₆₋₁₄ metil éster) y NMBR (PD168568 diclorohidrato) en el transporte de glucosa en adipocitos aislados de rata (n=2), sin alteraciones metabólicas, en presencia o ausencia de [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄. Resultados (media ± EEM) representados en porcentaje de incorporación de 2-deoxi-D-[1,2-³H(N)] glucosa, respecto al valor medio de control. * *p*<0,05 vs. células sin estímulos.

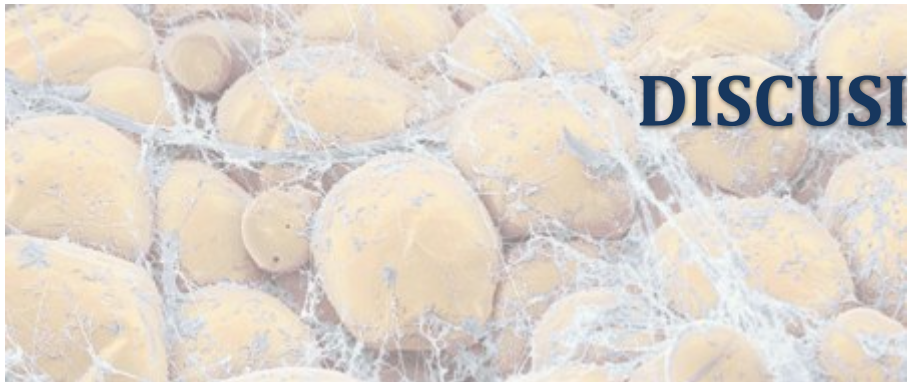
Especificidad de los efectos del [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄

A**B**

[D-Tyr ⁶ -β-Ala ¹¹ ,Phe ¹³ ,Nle ¹⁴]Bn ₆₋₁₄	-	+	-	+
Bantag-1	-	-	+	+

Figura 28. Efectos del antagonista del BRS-3 (Bantag-1) en el transporte de glucosa en adipocitos, tanto aislados de rata (A) (n=6) como diferenciados de humano (B) (n=2), ambos tipos celulares sin alteraciones metabólicas, en presencia o ausencia de [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄. Resultados (media ± EEM) representados en porcentaje de incorporación de 2-deoxi-D-[1,2-³H(N)] glucosa, respecto al valor medio de control. * $p < 0,05$ vs. células sin estímulos, § $p < 0,05$ vs. [D-Tyr⁶-β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]Bn₆₋₁₄.

Idénticos resultados se detectaron en los adipocitos de la línea celular de humano (Figura 28 B). La estimulación inducida por el ligando ($6,81 \pm 0,42$ fmol glucosa/ 10^5 células, $p < 0,05$ vs. control) se vio completamente abolida en combinación con el antagonista del BRS-3 (Bantag-1: $4,77 \pm 0,26$ nmol $^{14}\text{C}/10^5$ células; Bantag-1 + agonista: $4,96 \pm 0,40$ fmol glucosa/ 10^5 células), sin representar diferencias significativas con aquellas células incubadas sin estímulos ($4,42 \pm 0,26$ fmol glucosa/ 10^5 células).



DISCUSIÓN

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se ha investigado y documentado la participación del receptor BRS-3, junto a los efectos insulino-miméticos de su agonista [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ en el tejido adiposo, en relación a las alteraciones metabólicas de elevada prevalencia: obesidad y diabetes. El tejido adiposo, ha sido seleccionado por estar altamente involucrado en el desarrollo de la resistencia a la insulina, componente principal en el proceso obesogénico y cuya evolución deriva en la diabetes tipo 2 [10].

A diferencia de lo que sucede con sus homólogos de la familia de receptores bombesina, el NMBR y el GRPR, los estudios que referencian el receptor BRS-3 no son numerosos en la literatura científica. Para éstos, se han descrito ligandos naturales, mientras que el BRS-3 permanece como receptor huérfano, lo que ha limitado el desarrollo del conocimiento sobre su papel en la fisiología, asociada o no a estados patológicos [147]. A pesar de ello, los trabajos realizados en humanos [120,145,146,171] han confirmado:

- la implicación del receptor BRS-3 en la homeostasis de la glucosa,
- su asociación con patologías metabólicas frecuentes, como son la obesidad y la diabetes *mellitus*,
- y los efectos insulino-miméticos de su agonista sintético [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴] bombesina₆₋₁₄.

Afirmaciones todas ellas en concordancia con los estudios previos en el modelo animal de ratón KO modificado genéticamente, en el que la inactivación del gen codificante para el receptor BRS-3 desembocó en una obesidad leve [144,208,209].

Estos hechos han apuntado que tanto el receptor BRS-3, como sus agonistas, representan un nuevo enfoque terapéutico para la obesidad y la diabetes. En estas patologías, como ya se ha descrito en la sección de la Introducción, los tratamientos son escasos, y específicamente, los farmacológicos disponibles muy limitados, por lo que nuevas y eficaces dianas moleculares son de un interés relevante [143].

Los resultados obtenidos han corroborado que el tejido adiposo expresa el receptor BRS-3 ([143], www.genecards.org). Además, la comparación de su expresión, entre los distintos estadios metabólicos de los modelos animales y entre sujetos y pacientes, ha permitido asociar la disminución de la expresión del receptor con las alteraciones del metabolismo de la glucosa y lipídico [145].

Las expresiones del receptor BRS-3 más reducidas, se encuentran en los estadios diabéticos, tanto en los animales de experimentación, como en humanos, los cuales coinciden con niveles de

glucosa elevados y sostenidos en el tiempo, así como ha sido previamente descrito en miocitos humanos [145]. Estos resultados son compatibles con un potencial impacto de la hexosa en la expresión del receptor BRS-3.

El uso de modelos animales en este estudio, ha permitido recrear y controlar fases de las patologías de difícil acceso clínico en humanos, erigiéndose así, en una herramienta idónea para el análisis de estadios tempranos en las patologías metabólicas y su relación con el BRS-3. De este modo, se ha podido comprobar que el modelo animal de hiperlipidemia, con niveles de glucosa de 115 ± 3 mg/dl, muestra reducciones únicamente a nivel génico en la expresión del BRS-3, siendo éstas, además, menos acusadas que en estadios diabéticos. A pesar de ello, los niveles de proteína no fueron diferentes a los detectados en las ratas normales. Sin embargo, en las ratas insulino-resistentes, con normoglucemias, no se encontraron diferencias en la expresión del receptor. Estos resultados apoyarían el supuesto de que los niveles de glucosa en sangre puedan contribuir a la alteración en la expresión del BRS-3. Específicamente, parecen señalar que leves incrementos en los valores de glucosa, pudieran iniciar una reducción en la expresión del gen codificante para el receptor BRS-3 y que no es reflejada aún en los niveles de proteína.

En el caso de las muestras de grasa visceral de sujetos obesos se observó que la expresión del BRS-3 se encontraba significativamente reducida, tanto los niveles de ARNm como los de proteína, al igual que lo hallado en los pacientes diabéticos. Resultados que concuerdan con la posible influencia de los niveles de glucosa sobre la expresión del receptor y que ratifican aquellos obtenidos con anterioridad en miocitos humanos [145]. Análisis que evalúen el efecto directo de la glucosa, quedan pendientes de realización para discernir su participación en la regulación de la expresión del receptor. Aunque en la bibliografía también se ha descrito que los individuos obesos que desarrollan diabetes tipo 2, no sólo la expresión génica del receptor BRS-3, sino también la proteica, son significativamente inferiores a la detectada en sujetos diagnosticados con cada patología de forma individual. Este hecho, no sólo apunta una sinergia en el efecto reductor de estas dos condiciones sobre la expresión del receptor, sino que además, reafirma la posible asociación entre el empeoramiento metabólico y la expresión reducida del BRS-3 [145,146].

La ausencia completa del receptor, en el ratón KO, manifiesta un perfil metabólico en el ratón que a las 5 semanas de edad, a las 8 y a las 23, no revela diferencias en los niveles de glucosa medidos en ayunas y comparados con el no mutado. Sin embargo, a partir de la octava semana de vida los niveles de insulina se duplican, al igual que lo detectado en ratones de 20 semanas, en los que, además, la concentración de la hormona del crecimiento se redujo un 50 % [144]. De este modo se observa que la ausencia de BRS-3 no modifica los niveles de glucosa en plasma, aunque sí lo hace con los de insulina. Ésta es una situación con varias similitudes a la observada en el modelo animal insulino-resistente, el cual presenta elevados niveles de insulina y valores de glucosa

normales. El modelo lleva asociado una tendencia a la sobreexpresión, a nivel génico, del BRS-3; hecho que estaría favorecido por la acción de la hormona que ha sido documentada en este trabajo, así como en miocitos humanos [145]. Sin embargo, este efecto de la insulina, no tendría respuesta en el modelo de ratón con el gen para el BRS-3 delecionado, lo que realza la utilidad de los modelos metabólicos utilizados en este trabajo. Todas las observaciones anteriormente descritas, referencian las diferencias entre las acciones que se desencadenan con una carencia del receptor inducida genéticamente en el modelo de ratón, y una expresión disminuida del mismo, causada por alteraciones metabólicas.

Por otro lado, con el fin de descartar la influencia de un componente genético en la expresión del BRS-3, en este estudio se ha llevado a cabo la secuenciación de los tres exones codificantes, además de regiones UTR, del gen *BRS3* en pacientes obesos o diabéticos tipo 2. Las lecturas no fueron distintas a la secuencia de referencia en sujetos sin alteraciones metabólicas, tal y como fue descrito previamente en una publicación, donde se analizaron, únicamente, las secuencias de los tres exones en pacientes japoneses obesos y/o diabéticos, sin hallar ni mutaciones ni polimorfismos en el gen del *BRS3* [210].

La expresión del receptor BRS-3 en el tejido adiposo ha permitido llevar a cabo ensayos adicionales relacionados con las acciones del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ a través del mismo, y evidenciar que el receptor, no solamente se expresa en dicho tejido, sino que además es funcional ([120,143,145,146], www.genecards.org). En este sentido, los estudios funcionales realizados —transporte de glucosa y lipogénesis— han sugerido un mayor número de receptores en el tejido humano respecto a los de la rata, tal y como ha sido descrito previamente, lo que potencia su valor terapéutico [143].

Para la realización de los estudios, se han utilizado adipocitos aislados de rata y líneas celulares humanas de adipocitos diferenciados, sin alteraciones metabólicas. En ambos tipos celulares, la presencia del agonista a concentraciones fisiológicas, indujo incrementos significativos de la expresión génica del BRS-3, análogamente al efecto producido por la insulina. Estos resultados señalan que tanto el ligando sintético como la hormona podrían actuar como posibles mediadores de la regulación del gen del receptor BRS-3 [145].

De acuerdo con ello, las imágenes obtenidas mediante microscopia confocal, confirman que incrementos de los valores de la expresión del receptor, fueron observados en las células incubadas en presencia de la insulina o del compuesto, tal y como se ha descrito en células que expresan elevados niveles de receptor de insulina, donde distintos procesos de regulación pueden ser inducidos por la hormona [211,212]. La participación de la insulina, en la modulación de la expresión del BRS-3, ha sido también descrita en miocitos de sujetos sin alteraciones metabólicas, además de en pacientes obesos o diabéticos tipo 2 [145]. Así mismo, en el modelo animal de

insulino-resistencia, se apunta una tendencia a la sobreexpresión génica del receptor, que pudiera estar inducida por los elevados niveles de la hormona. A pesar de ello, el aumento no se manifiesta a nivel proteico, sin diferir de los valores de receptor BRS-3 que muestran las ratas sin alteraciones metabólicas.

Para profundizar en el efecto desencadenante del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ en la señalización celular, a través de la activación del receptor BRS-3, se han examinado las vías de señalización de la insulina en adipocitos de rata y en los humanos, sin alteraciones metabólicas. Los hallazgos descritos apoyan la afirmación de que en dichos adipocitos, las quinasas PKB, p70s6K, p42/44 MAPKs y p90 RSK-1, están involucradas en la respuesta metabólica al ligando sintético, al igual que en la de la insulina. De hecho, todos los niveles de fosforilación de las quinasas mejoraron en presencia del agonista, como previamente se ha publicado en cultivo primario de miocitos procedentes de sujetos sanos, obesos y/o diabéticos tipo 2 [120,146]. Además, ha sido detallado que en la línea celular BALB-3T3 transfectada con BRS-3 humano, el ligando mostró también capacidad para incrementar la fosforilación de p125FAK [187]. Tanto el [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴] bombesina₆₋₁₄, al igual que otros agonistas del receptor, estimularon la transactivación de CREB, resultando en modestos aumentos de la transcripción de genes dependientes de CRE, así como la fosforilación de CREB dependiente del tiempo, en respuesta a la activación selectiva del BRS-3 humano a través de MEK-1, PKC, PKA, PKB y p90 RSK [146,180]. En la línea celular NCI-1299 de cáncer de pulmón, también transfectada con BRS-3 humano, su activación resultó en una estimulación de Elk-1, de una manera dependiente de MEK-1, que a su vez produjo un incremento en el ARNm de c-fos [213]. Determinadas quinasas implicadas en la señalización del BRS-3, además, se han descrito en la cascada de señales del GRPR, como es el caso del sistema PI3K/PKB y p70s6K, que en varios estudios *in vitro*, se ha informado de su mediación en los efectos proliferativos del receptor [214–216]. Cuando se induce el silenciamiento del GRPR, en la línea celular BE(2)-C de neuroblastoma, la fosforilación de la PKB, modulador esencial de la supervivencia celular y la metástasis, se subregula, al igual que la fosforilación de la p70s6K, quinasa crucial en la síntesis de proteína y el metabolismo celular [216].

Con el fin de evaluar los efectos insulino-miméticos del agonista en el tejido adiposo, se examinaron las respuestas de los adipocitos aislados de rata y de células humanas sin alteraciones metabólicas, en el transporte de glucosa y en la lipogénesis. Ello se debe a que se ha descrito que la hiperinsulinemia y las disminuciones significativas de la secreción de la hormona parecen tener un impacto en los parámetros relativos a la regulación del almacenamiento y consumo de lípidos, como transporte de la hexosa, lipogénesis y lipólisis, en el modelo animal deficiente de BRS-3 [144].

El ligando aumentó de manera dosis dependiente la incorporación de 2-desoxi-D-glucosa, alcanzando su máximo a concentraciones 10^{-8} M, al igual que lo observado con la insulina, tanto en animal como en humano. Y aunque los aumentos en los niveles de ARN mensajero del Glut-4 no alcanzaron significancia estadística, a excepción de la concentración de 10^{-9} M del ligando en adipocitos de rata, sí mostraron una tendencia al alza, que se tradujo en un aumento de la translocación de Glut-4 a la membrana celular, confirmándose que estos efectos eran similares a la estimulación inducida por la presencia de insulina y también como se ha detectado en el tejido muscular [145].

De acuerdo a datos *in vivo* en el ratón deficiente de BRS-3, no sólo la insulina no aumentó la captación de la glucosa en los adipocitos, sino que el animal mostró la tolerancia a la hormona alterada, indicando por tanto, la presencia de resistencia a la insulina en las células adiposas [144,217]. Es más, en este modelo, se detectó una modificación en la translocación del Glut-4 como causa potencial de la escasa captación de la glucosa inducida por la hormona [217]. No obstante, miocitos de cultivo primario obtenidos de pacientes diagnosticados con obesidad y/o diabetes tipo 2, mostraron conservar la capacidad de responder, no sólo a la insulina, sino también al [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ [120,146]. Estos resultados, vuelven a evidenciar las diferencias entre los efectos originados por la delección genética del receptor y la reducción del mismo inducida por alteraciones metabólicas.

En lo referente a la captación y el almacenamiento de lípidos, el agonista sintético mostró incrementarlos y de forma dependiente a su concentración, alcanzando niveles máximos similares a los inducidos por la insulina. Los efectos ejercidos por el ligando en ambos, transporte de glucosa y lipogénesis, están mediados por la fosforilación de quinasas —PKB, MAPKS, p70s6K y p90 RSK-1— cuyos inhibidores —Wortmanina, PD98059 y Rapamicina— abolieron por completo la estimulación del transporte de la hexosa generado por el agonista del BRS-3, tanto en adipocitos de rata como en humanos, al igual que lo descrito en miocitos de sujetos sin alteraciones metabólicas [145]. Sin embargo, en lo que se refiere al proceso lipogénico, inhibiciones completas del efecto del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ se observaron únicamente en presencia de la Wortmanina y del PD98059. En el caso concreto de la Rapamicina, este inhibidor bloqueó el efecto máximo del compuesto en las células humanas, sin embargo, en los adipocitos de rata, está inhibición fue parcial, manteniéndose un efecto significativo estimulador respecto al control. En este estudio, se demuestra que el ligando agonista del BRS-3, induce efectos similares a los de la insulina y otros péptidos con propiedades antidiabéticas, tales como GLP-1 y exendina-4 en células adiposas, los cuales han sido también propuestos como terapias hipoglucémicas [207,218]. Estos péptidos utilizaron las mismas vías de señalización de la insulina, aumentando la fosforilación de idénticas quinasas. Una acción semejante a la producida por la Rapamicina ha sido

descrita en cultivo primario de miocitos humanos, donde el efecto estimulador del GLP-1, sobre el transporte de glucosa, se redujo de manera parcial [219]. Por el contrario, en adipocitos aislados de rata, el efecto del GLP-1 fue completamente anulado por la presencia de dicho inhibidor, al igual que lo detectado con el compuesto exendina-4. Específicamente la Rapamicina no inhibió su efecto estimulador sobre la captación de glucosa ni en ratas, ni en células humanas [207,219].

A pesar de todas las acciones descritas del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ en el tejido muscular y en el adiposo, el hecho de que sea un ligando universal para todos los receptores de la familia bombesina, ha cuestionado que los efectos que produce se realicen, únicamente, a través del receptor BRS-3, y no del GRPR y del NMBR, en aquellos tejidos que expresen receptores bombesina adicionales a éste. Como es el caso del tejido adiposo, en el que se expresan los tres receptores bombesina ([160,161,164,220], www.genecards.com).

Sin embargo, las acciones estimuladoras del ligando, que han sido descritas en este trabajo, se han verificado y atribuido, en exclusividad, a la activación del BRS-3, ya que la presencia de inhibidores del GRPR y del NMBR, con baja afinidad por el BRS-3 —el [D-Phe⁶]Bn₆₋₁₃ métilester y el PD168368, respectivamente—, no han modificado el efecto del agonista [145,221]. Sin embargo, la acción fue completamente abolida por la presencia del antagonista del BRS-3, el Bantag-1, tal y como fue descrito en los estudios de silenciamiento del gen *BRS3* en el tejido muscular [145].

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en tejido adiposo, será interesante explorar si los adipocitos siguen el mismo patrón que las células musculares, en las que el ligando sintético muestra un efecto normalizador de los parámetros relacionados con un metabolismo de la glucosa deteriorado en los estadios de obesidad y de diabetes, y se detecta, además, una mayor sensibilidad de las células al mismo [120,145,146].

Por otro lado, para disponer de una visión global de los efectos insulino-miméticos del [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄ a nivel sistémico, las futuras líneas de investigación en el área del BRS-3 deberían enfocarse, principalmente, a los estudios *in vivo* de modelos experimentales de las alteraciones metabólicas ligadas a la obesidad y la diabetes, así como a sus estadios iniciales.



CONCLUSIONES

7. CONCLUSIONES

Tomando en consideración todos los resultados expuestos, con este trabajo se puede concluir lo siguiente:

- Los niveles de expresión del BRS-3 están reducidos, tanto en tejido adiposo de modelos experimentales con hiperlipidemia, diabetes tipo 1 o tipo 2 y de sujetos obesos o diabéticos tipo 2, respecto a un estado metabólico no alterado, existiendo una reducción de la expresión del receptor con el empeoramiento del metabolismo.
- En tejido adiposo de modelo animal con insulino-resistencia, los niveles de expresión del receptor BRS-3 no se modificaron significativamente respecto a un estado metabólico normal, aunque mostraron una tendencia al aumento en la expresión génica, apuntando a las elevadas concentraciones de insulina como responsables de esta acción, y postulando que la presencia de altas concentraciones de glucosa inducen una acción perjudicial del metabolismo.
- No se han identificado mutaciones y/o polimorfismos en el gen que codifica el receptor BRS-3 en humanos con alteraciones metabólicas que pudieran explicar las expresiones reducidas del receptor en tejido adiposo.
- En adipocitos aislados de rata, y en la línea celular de adipocitos humanos —sin alteraciones metabólicas—, el efecto del ligando [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴] bombesina₆₋₁₄, a través del receptor BRS-3 induce:
 1. Modulación de la expresión del receptor BRS-3, al igual que lo inducido por la insulina.
 2. Activación de los mecanismos de señalización intracelular, de manera similar a la insulina.
 3. Estimulación de la expresión del Glut-4 y el transporte de glucosa, tal y como ha sido descrito previamente con la presencia de insulina.
 4. Incremento del almacenamiento de lípidos, similarmente a lo producido por la insulina.

En tanto en cuanto no se solventen los defectos origen de las patologías metabólicas —obesidad y la diabetes *mellitus*—, se hace necesaria la búsqueda y el desarrollo de terapias eficaces, que soslayen o compensen las alteraciones en el metabolismo de la glucosa y lipídico. Los resultados de este trabajo apoyan el concepto del receptor BRS-3 como nueva diana molecular, así como a su péptido agonista [D-Tyr⁶,β-Ala¹¹,Phe¹³,Nle¹⁴]bombesina₆₋₁₄, o cualquier modificación estructural del mismo, como herramientas terapéuticas para la obesidad y la diabetes.



BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Harris JA, Benedict FG. *A Biometric Study of Human Basal Metabolism*. Proc Natl Acad Sci U S A **1918**;4:370–3. PMID:16576330.
- [2] Poehlman ET. *A review: exercise and its influence on resting energy metabolism in man*. Med Sci Sports Exerc **1989**;21:515–25. PMID:2691813.
- [3] Donahoo WT, Levine JA, Melanson EL. *Variability in energy expenditure and its components*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care **2004**;7:599–605. PMID:15534426.
- [4] Kelly SJ, Lilley JM, Leonardi-Bee J. *Associations of morbidity in the underweight*. Eur J Clin Nutr **2010**;64:475–82. PMID:20216568.
- [5] Pond CM. *An evolutionary and functional view of mammalian adipose tissue*. Proc Nutr Soc **1992**;51:367–77. PMID:1480631.
- [6] Caballero B. *The Global Epidemic of Obesity: An Overview*. Epidemiol Rev **2007**;29:1–5. PMID:17569676.
- [7] Bowman SA, Gortmaker SL, Ebbeling CB, Pereira MA, Ludwig DS. *Effects of fast-food consumption on energy intake and diet quality among children in a national household survey*. Pediatrics **2004**;113:112–8. PMID:14702458.
- [8] Tigbe WW, Granat MH, Sattar N, Lean MEJ. *Time spent in sedentary posture is associated with waist circumference and cardiovascular risk*. Int J Obes (Lond) **2017**. PMID:28138134.
- [9] Jung UJ, Choi M-S. *Obesity and its metabolic complications: the role of adipokines and the relationship between obesity, inflammation, insulin resistance, dyslipidemia and nonalcoholic fatty liver disease*. Int J Mol Sci **2014**;15:6184–223. PMID:24733068.
- [10] Tchernof A, Després J-P. *Pathophysiology of human visceral obesity: an update*. Physiol Rev **2013**;93:359–404. PMID:23303913.
- [11] James WPT. *WHO recognition of the global obesity epidemic*. Int J Obes **2008**;32:S120–6. PMID:19136980.
- [12] World Health Organization. *Manual of the International Statistical Classification Diseases, injuries, and causes of death. Sixth Revision of the International Lists of Diseases and Causes of Death*. Génova: **1949**.
- [13] Organización Mundial de la Salud. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation*. World Health Organ Tech Rep Ser **2000**;894:i–xii, 1–253. PMID:11234459.
- [14] Organización Mundial de la Salud. *Global Status Report on non-communicable diseases 2014*. Génova: **2014**.
- [15] UNICEF, WHO, World Bank Group. *Levels and trends in child malnutrition*. **2015**.
- [16] Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogdon JG, Pan L, Sherry B, et al. *Obesity and severe obesity forecasts through 2030*. Am J Prev Med **2012**;42:563–70. PMID:22608371.
- [17] Keys A, Fidanza F, Karvonen MJ, Kimura N, Taylor HL. *Indices of relative weight and obesity*. Int J Epidemiol **2014**;43:655–65. PMID:24691951.
- [18] Patel A V., Hildebrand JS, Gapstur SM. *Body mass index and all-cause mortality in a large prospective cohort of white and black U.S. Adults*. PLoS One **2014**;9:e109153. PMID:25295620.
- [19] Berrington de Gonzalez A, Hartge P, Cerhan JR, Flint AJ, Hannan L, MacInnis RJ, et al. *Body-mass index and mortality among 1.46 million white adults*. N Engl J Med **2010**;363:2211–9. PMID:21121834.

- [20] Heymsfield SB, Cefalu WT. *Does body mass index adequately convey a patient's mortality risk?* JAMA **2013**;309:87–8. PMID:23280230.
- [21] Lee M-J, Wu Y, Fried SK. *Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications.* Mol Aspects Med **2013**;34:1–11. PMID:23068073.
- [22] Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerbäck S, et al. *Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans.* Diabetes **2014**;63:4089–99. PMID:25056438.
- [23] Shen W, Wang Z, Punyanita M, Lei J, Sinav A, Kral JG, et al. *Adipose tissue quantification by imaging methods: a proposed classification.* Obes Res **2003**;11:5–16. PMID:12529479.
- [24] Sacks HS, Fain JN. *Human epicardial adipose tissue: a review.* Am Heart J **2007**;153:907–17. PMID:17540190.
- [25] Cinti S. *The adipose organ: morphological perspectives of adipose tissues.* Proc Nutr Soc **2001**;60:319–28. PMID:11681806.
- [26] Krotkiewski M, Björntorp P, Sjöström L, Smith U. *Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution.* J Clin Invest **1983**;72:1150–62. PMID:6350364.
- [27] Vague JM. *Sexual Differentiation. A determinant Factor of the forms of Obesity.* Presse Med **1947**;55:339. PMID:18918084.
- [28] Fox CS, Massaro JM, Hoffmann U, Pou KM, Maurovich-Horvat P, Liu C-Y, et al. *Abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue compartments: association with metabolic risk factors in the Framingham Heart Study.* Circulation **2007**;116:39–48. PMID:17576866.
- [29] Vega GL, Adams-Huet B, Peshock R, Willett D, Shah B, Grundy SM. *Influence of body fat content and distribution on variation in metabolic risk.* J Clin Endocrinol Metab **2006**;91:4459–66. PMID:16926254.
- [30] Snijder MB, Visser M, Dekker JM, Goodpaster BH, Harris TB, Kritchevsky SB, et al. *Low subcutaneous thigh fat is a risk factor for unfavourable glucose and lipid levels, independently of high abdominal fat. The Health ABC Study.* Diabetologia **2005**;48:301–8. PMID:15660262.
- [31] Ohlson LO, Larsson B, Svärdsudd K, Welin L, Eriksson H, Wilhelmsen L, et al. *The influence of body fat distribution on the incidence of diabetes mellitus. 13.5 years of follow-up of the participants in the study of men born in 1913.* Diabetes **1985**;34:1055–8. PMID:4043554.
- [32] St-Pierre J, Lemieux I, Perron P, Brisson D, Santur  M, Vohl M-C, et al. *Relation of the "hypertriglyceridemic waist" phenotype to earlier manifestations of coronary artery disease in patients with glucose intolerance and type 2 diabetes mellitus.* Am J Cardiol **2007**;99:369–73. PMID:17261400.
- [33] Ashwell M, Gunn P, Gibson S. *Waist-to-height ratio is a better screening tool than waist circumference and BMI for adult cardiometabolic risk factors: systematic review and meta-analysis.* Obes Rev **2012**;13:275–86. PMID:22106927.
- [34] Hwang Y-C, Hayashi T, Fujimoto WY, Kahn SE, Leonetti DL, McNeely MJ, et al. *Visceral abdominal fat accumulation predicts the conversion of metabolically healthy obese subjects to an unhealthy phenotype.* Int J Obes (Lond) **2015**;39:1365–70. PMID:25920773.
- [35] World Health Organization. *Waist Circumference and Waist-Hip Ratio Report of a WHO Expert Consultation.* G nova: **2011**.
- [36] Lemieux I, Poirier P, Bergeron J, Al  ras N, Lamarche B, Cantin B, et al. *Hypertriglyceridemic waist: a useful screening phenotype in preventive cardiology?* Can J Cardiol **2007**;23 Suppl B:23B–31B. PMID:17932584.
- [37] Bacopoulou F, Efthymiou V, Landis G, Rentoumis A, Chrousos GP. *Waist circumference,*

- waist-to-hip ratio and waist-to-height ratio reference percentiles for abdominal obesity among Greek adolescents.* BMC Pediatr **2015**;15:50. PMID:25935716.
- [38] Tokunaga K, Matsuzawa Y, Ishikawa K, Tarui S. *A novel technique for the determination of body fat by computed tomography.* Int J Obes **1983**;7:437–45. PMID:6642855.
- [39] Graffy PM, Pickhardt PJ. *Quantification of hepatic and visceral fat by CT and MR imaging: relevance to the obesity epidemic, metabolic syndrome and NAFLD.* Br J Radiol **2016**;89:20151024. PMID:26876880.
- [40] Fritscher LG, Mottin CC, Canani S, Chatkin JM. *Obesity and obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome: the impact of bariatric surgery.* Obes Surg **2007**;17:95–9. PMID:17355775.
- [41] Yamamoto S, Nakagawa T, Matsushita Y, Kusano S, Hayashi T, Irokawa M, et al. *Visceral fat area and markers of insulin resistance in relation to colorectal neoplasia.* Diabetes Care **2010**;33:184–9. PMID:19837793.
- [42] von Hafe P, Pina F, Pérez A, Tavares M, Barros H. *Visceral fat accumulation as a risk factor for prostate cancer.* Obes Res **2004**;12:1930–5. PMID:15687393.
- [43] Ryan AM, Duong M, Healy L, Ryan SA, Parekh N, Reynolds J V., et al. *Obesity, metabolic syndrome and esophageal adenocarcinoma: epidemiology, etiology and new targets.* Cancer Epidemiol **2011**;35:309–19. PMID:21470937.
- [44] Stamler R, Stamler J, Riedlinger WF, Algera G, Roberts RH. *Weight and blood pressure. Findings in hypertension screening of 1 million Americans.* JAMA **1978**;240:1607–10. PMID:691146.
- [45] Pascot A, Lemieux I, Prud'homme D, Tremblay A, Nadeau A, Couillard C, et al. *Reduced HDL particle size as an additional feature of the atherogenic dyslipidemia of abdominal obesity.* J Lipid Res **2001**;42:2007–14. PMID:11734573.
- [46] Liu J, Fox CS, Hickson DA, May WD, Hairston KG, Carr JJ, et al. *Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study.* J Clin Endocrinol Metab **2010**;95:5419–26. PMID:20843952.
- [47] Hayashi T, Boyko EJ, Leonetti DL, McNeely MJ, Newell-Morris L, Kahn SE, et al. *Visceral adiposity and the risk of impaired glucose tolerance: a prospective study among Japanese Americans.* Diabetes Care **2003**;26:650–5. PMID:12610016.
- [48] Hanley AJG, Wagenknecht LE, Norris JM, Bryer-Ash M, Chen YI, Anderson AM, et al. *Insulin resistance, beta cell dysfunction and visceral adiposity as predictors of incident diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study (IRAS) Family study.* Diabetologia **2009**;52:2079–86. PMID:19641896.
- [49] Wang Y, Rimm EB, Stampfer MJ, Willett WC, Hu FB. *Comparison of abdominal adiposity and overall obesity in predicting risk of type 2 diabetes among men.* Am J Clin Nutr **2005**;81:555–63. PMID:15755822.
- [50] González N, Moreno-villegas Z, González-bris A, Egido J, Lorenzo Ó. *Regulation of visceral and epicardial adipose tissue for preventing cardiovascular injuries associated to obesity and diabetes.* Cardiovasc Diabetol **2017**;16:44. PMID:28376896.
- [51] Ross R, Aru J, Freeman J, Hudson R, Janssen I. *Abdominal adiposity and insulin resistance in obese men.* Am J Physiol Endocrinol Metab **2002**;282:E657–63. PMID:11832370.
- [52] Ferrante AW. *The immune cells in adipose tissue.* Diabetes Obes Metab **2013**;15 Suppl 3:34–8. PMID:24003919.
- [53] Giralt M, Villarroya F. *White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions?.* Endocrinology **2013**;154:2992–3000. PMID:23782940.
- [54] Hajer GR, van Haeften TW, Visseren FLJ. *Adipose tissue dysfunction in obesity, diabetes, and*

- vascular diseases. *Eur Heart J* **2008**;29:2959–71. PMID:18775919.
- [55] Galic S, Oakhill JS, Steinberg GR. *Adipose tissue as an endocrine organ*. *Mol Cell Endocrinol* **2010**;316:129–39. PMID:19723556.
 - [56] Trujillo ME, Scherer PE. *Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease*. *Endocr Rev* **2006**;27:762–78. PMID:17056740.
 - [57] Langerhans P. *Ueber die Nerven der menschlichen Haut*. *Arch Für Pathol Anat Und Physiol Und Für Klin Med* **1868**;44:325–37.
 - [58] Banerjee RR, Lazar MA. *Resistin: molecular history and prognosis*. *J Mol Med (Berl)* **2003**;81:218–26. PMID:12700889.
 - [59] Muir LA, Neeley CK, Meyer KA, Baker NA, Brosius AM, Washabaugh AR, et al. *Adipose tissue fibrosis, hypertrophy, and hyperplasia: Correlations with diabetes in human obesity*. *Obesity (Silver Spring)* **2016**;24:597–605. PMID:26916240.
 - [60] Oh K-J, Lee D, Kim W, Han B, Lee S, Bae K-H. *Metabolic Adaptation in Obesity and Type II Diabetes: Myokines, Adipokines and Hepatokines*. *Int J Mol Sci* **2016**. PMID:28025491.
 - [61] Goldstein BJ. *Insulin resistance: from benign to type 2 diabetes mellitus*. *Rev Cardiovasc Med* **2003**;4 Suppl 6:S3-10. PMID:14668698.
 - [62] Kahn SE. *The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes*. *Diabetologia* **2003**;46:3–19. PMID:12637977.
 - [63] American Diabetes Association. *Standards of medical care in diabetes-2017*. *Diabetes Care* **2017**;40:1–135.
 - [64] Alberti KGMM, Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ, Cleeman JI, Donato KA, et al. *Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International .* *Circulation* **2009**;120:1640–5. PMID:19805654.
 - [65] International Diabetes Federation. *IDF Diabetes Atlas*. 7th ed. Bruselas, Bélgica: <http://www.diabetesatlas.org/component/attachments/?task=download&id=164>; **2015**.
 - [66] Sims EA, Danforth E, Horton ES, Bray GA, Glennon JA, Salans LB. *Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man*. *Recent Prog Horm Res* **1973**;29:457–96. PMID:4750591.
 - [67] Bays HE, Chapman RH, Grandy S, SHIELD Investigators' Group. *The relationship of body mass index to diabetes mellitus, hypertension and dyslipidaemia: comparison of data from two national surveys*. *Int J Clin Pract* **2007**;61:737–47. PMID:17493087.
 - [68] DIAMOND Project Group. *Incidence and trends of childhood Type 1 diabetes worldwide 1990-1999*. *Diabet Med* **2006**;23:857–66. PMID:16911623.
 - [69] Patterson CC, Dahlquist GG, Gyürüs E, Green A, Soltész G, EURODIAB Study Group. *Incidence trends for childhood type 1 diabetes in Europe during 1989-2003 and predicted new cases 2005-20: a multicentre prospective registration study*. *Lancet (London, England)* **2009**;373:2027–33. PMID:19481249.
 - [70] Iacobellis G, Singh N, Wharton S, Sharma AM. *Substantial changes in epicardial fat thickness after weight loss in severely obese subjects*. *Obesity (Silver Spring)* **2008**;16:1693–7. PMID:18451775.
 - [71] Kim M-K, Tomita T, Kim M-J, Sasai H, Maeda S, Tanaka K. *Aerobic exercise training reduces epicardial fat in obese men*. *J Appl Physiol* **2009**;106:5–11. PMID:18927266.
 - [72] Fu C-P, Sheu WH-H, Lee I-T, Tsai I-C, Lee W-J, Liang K-W, et al. *Effects of weight loss on*

- epicardial adipose tissue thickness and its relationship between serum soluble CD40 ligand levels in obese men.* Clin Chim Acta **2013**;421:98–103. PMID:23499571.
- [73] Varady KA, Hellerstein MK. *Do calorie restriction or alternate-day fasting regimens modulate adipose tissue physiology in a way that reduces chronic disease risk?* Nutr Rev **2008**;66:333–42. PMID:18522622.
- [74] Klempel MC, Varady KA. *Reliability of leptin, but not adiponectin, as a biomarker for diet-induced weight loss in humans.* Nutr Rev **2011**;69:145–54. PMID:21348878.
- [75] Staiano AE, Marker AM, Beyl RA, Hsia DS, Katzmarzyk PT, Newton RL. *A randomized controlled trial of dance exergaming for exercise training in overweight and obese adolescent girls.* Pediatr Obes **2016**. PMID:26918815.
- [76] Polak J, Klimcakova E, Moro C, Viguerie N, Berlan M, Hejnova J, et al. *Effect of aerobic training on plasma levels and subcutaneous abdominal adipose tissue gene expression of adiponectin, leptin, interleukin 6, and tumor necrosis factor alpha in obese women.* Metabolism **2006**;55:1375–81. PMID:16979409.
- [77] Ross R, Hudson R, Stotz PJ, Lam M. *Effects of exercise amount and intensity on abdominal obesity and glucose tolerance in obese adults: a randomized trial.* Ann Intern Med **2015**;162:325–34. PMID:25732273.
- [78] Boidin M, Lapierre G, Paquette Tanir L, Nigam A, Juneau M, Guilbeault V, et al. *Effect of aquatic interval training with Mediterranean diet counseling in obese patients: results of a preliminary study.* Ann Phys Rehabil Med **2015**;58:269–75. PMID:26233941.
- [79] Corella D, Qi L, Sorlí J V., Godoy D, Portolés O, Coltell O, et al. *Obese subjects carrying the 11482G>A polymorphism at the perilipin locus are resistant to weight loss after dietary energy restriction.* J Clin Endocrinol Metab **2005**;90:5121–6. PMID:15985482.
- [80] Phares DA, Halverstadt AA, Shuldiner AR, Ferrell RE, Douglass LW, Ryan AS, et al. *Association between body fat response to exercise training and multilocus ADR genotypes.* Obes Res **2004**;12:807–15. PMID:15166301.
- [81] Fried M, Yumuk V, Oppert JM, Scopinaro N, Torres A, Weiner R, et al. *Interdisciplinary European guidelines on metabolic and bariatric surgery.* Obes Surg **2014**;24:42–55. PMID:24081459.
- [82] Nguyen NT, Varela JE. *Bariatric surgery for obesity and metabolic disorders: state of the art.* Nat Rev Gastroenterol Hepatol **2016**. PMID:27899816.
- [83] Auclair A, Martin J, Bastien M, Bonneville N, Biertho L, Marceau S, et al. *Is There a Role for Visceral Adiposity in Inducing Type 2 Diabetes Remission in Severely Obese Patients Following Biliopancreatic Diversion with Duodenal Switch Surgery?* Obes Surg **2016**;26:1717–27. PMID:26660319.
- [84] Wu F-Z, Huang Y-L, Wu CC, Wang Y-C, Pan H-J, Huang C-K, et al. *Differential Effects of Bariatric Surgery Versus Exercise on Excessive Visceral Fat Deposits.* Medicine (Baltimore) **2016**;95:e2616. PMID:26844473.
- [85] De Vuono S, Ricci MA, Siepi D, Boni M, Gentili A, Scavizzi M, et al. *Laparoscopic sleeve gastrectomy modifies cholesterol synthesis but not cholesterol absorption.* Obes Res Clin Pract **2017**. PMID:28057416.
- [86] Kong L-C, Tap J, Aron-Wisniewsky J, Pelloux V, Basdevant A, Bouillot J-L, et al. *Gut microbiota after gastric bypass in human obesity: increased richness and associations of bacterial genera with adipose tissue genes.* Am J Clin Nutr **2013**;98:16–24. PMID:23719559.
- [87] Ionut V, Burch M, Youdim A, Bergman RN. *Gastrointestinal hormones and bariatric surgery-induced weight loss.* Obesity (Silver Spring) **2013**;21:1093–103. PMID:23512841.

- [88] Chakravartty S, Tassinari D, Salerno A, Giorgakis E, Rubino F. *What is the Mechanism Behind Weight Loss Maintenance with Gastric Bypass?*. Curr Obes Rep **2015**;4:262–8. PMID:26627220.
- [89] Trapp S, Richards JE. *The gut hormone glucagon-like peptide-1 produced in brain: is this physiologically relevant?*. Curr Opin Pharmacol **2013**;13:964–9. PMID:24075717.
- [90] Bandstein M, Mwinyi J, Ernst B, Thurnheer M, Schultes B, Schiöth HB. *A genetic variant in proximity to the gene LYPLAL1 is associated with lower hunger feelings and increased weight loss following Roux-en-Y gastric bypass surgery*. Scand J Gastroenterol **2016**;51:1050–5. PMID:27181159.
- [91] Sevilla S, Hubal MJ. *Genetic modifiers of obesity and bariatric surgery outcomes*. Semin Pediatr Surg **2014**;23:43–8. PMID:24491368.
- [92] Rabkin SW, Campbell H. *Comparison of reducing epicardial fat by exercise, diet or bariatric surgery weight loss strategies: a systematic review and meta-analysis*. Obes Rev **2015**;16:406–15. PMID:25753297.
- [93] Zeller MH, Reiter-Purtill J, Ratcliff MB, Inge TH, Noll JG. *Two-year trends in psychosocial functioning after adolescent Roux-en-Y gastric bypass*. Surg Obes Relat Dis **2011**;7:727–32. PMID:21497142.
- [94] Yusuf M, Dalrymple K, Bernstein MH, Walsh E, Rosenstein L, Chelminski I, et al. *Body mass index, depression, and suicidality: The role of self-esteem in bariatric surgery candidates*. J Affect Disord **2017**;208:238–47. PMID:27792969.
- [95] Kovacs Z, Valentin JB, Nielsen RE. *Risk of psychiatric disorders, self-harm behaviour and service use associated with bariatric surgery*. Acta Psychiatr Scand **2017**;135:149–58. PMID:27864830.
- [96] Dixon JB. *Self-harm and suicide after bariatric surgery: time for action*. Lancet Diabetes Endocrinol **2016**;4:199–200. PMID:26781231.
- [97] Onakpoya IJ, Heneghan CJ, Aronson JK. *Post-marketing withdrawal of anti-obesity medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review*. BMC Med **2016**;14:191. PMID:27894343.
- [98] Heck AM, Yanovski JA, Calis KA. *Orlistat, a new lipase inhibitor for the management of obesity*. Pharmacotherapy **2000**;20:270–9. PMID:10730683.
- [99] Delahanty LM, Dalton KM, Porneala B, Chang Y, Goldman VM, Levy D, et al. *Improving diabetes outcomes through lifestyle change-A randomized controlled trial*. Obesity (Silver Spring) **2015**;23:1792–9. PMID:26260043.
- [100] Mingrone G, Panunzi S, De Gaetano A, Guidone C, Iaiconelli A, Nanni G, et al. *Bariatric-metabolic surgery versus conventional medical treatment in obese patients with type 2 diabetes: 5 year follow-up of an open-label, single-centre, randomised controlled trial*. Lancet (London, England) **2015**;386:964–73. PMID:26369473.
- [101] Israili ZH. *Advances in the treatment of type 2 diabetes mellitus*. Am J Ther **2011**;18:117–52. PMID:19834322.
- [102] Tran L, Zielinski A, Roach AH, Jende JA, Householder AM, Cole EE, et al. *Pharmacologic treatment of type 2 diabetes: oral medications*. Ann Pharmacother **2015**;49:540–56. PMID:25667196.
- [103] Zonszein J, Groop P-H. *Strategies for Diabetes Management: Using Newer Oral Combination Therapies Early in the Disease*. Diabetes Ther **2016**;7:621–39. PMID:27796904.
- [104] Younk LM, Mikeladze M, Davis SN. *Pramlintide and the treatment of diabetes: a review of the data since its introduction*. Expert Opin Pharmacother **2011**;12:1439–51. PMID:21564002.

- [105] Banting FG, Best CH, Collip JB, Campbell WR, Fletcher AA. *Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus: Preliminary Report*. Can Med Assoc J **1962**;87:1062–7. PMID:20327305.
- [106] Davidson MB. *Insulin Therapy: A Personal Approach*. Clin Diabetes **2015**;33:123–35.
- [107] de Luis DA, Romero E. *Análogos de insulina: Modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas*. Semergen **2013**;39:34–40. PMID:23517895.
- [108] Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. *Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states*. Cold Spring Harb Perspect Biol **2014**;6. PMID:24384568.
- [109] Litherland GJ, Hajduch E, Hundal HS. *Intracellular signalling mechanisms regulating glucose transport in insulin-sensitive tissues (review)*. Mol Membr Biol **2001**;18:195–204. PMID:11681786.
- [110] Imamura T, Huang J, Usui I, Satoh H, Bever J, Olefsky JM. *Insulin-induced GLUT4 translocation involves protein kinase C-lambda-mediated functional coupling between Rab4 and the motor protein kinesin*. Mol Cell Biol **2003**;23:4892–900. PMID:12832475.
- [111] Thorens B, Mueckler M. *Glucose transporters in the 21st Century*. Am J Physiol Endocrinol Metab **2010**;298:E141–5. PMID:20009031.
- [112] Wood IS, Trayhurn P. *Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins*. Br J Nutr **2003**;89:3–9. PMID:12568659.
- [113] Baldwin SA. *Mammalian passive glucose transporters: members of an ubiquitous family of active and passive transport proteins*. Biochim Biophys Acta **1993**;1154:17–49. PMID:8507645.
- [114] Kahn BB. *Lilly lecture 1995. Glucose transport: pivotal step in insulin action*. Diabetes **1996**;45:1644–54. PMID:8866574.
- [115] Calderhead DM, Kitagawa K, Tanner LI, Holman GD, Lienhard GE. *Insulin regulation of the two glucose transporters in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem **1990**;265:13801–8. PMID:2199443.
- [116] Zorzano A, Wilkinson W, Kotliar N, Thoidis G, Wadzinski BE, Ruoho AE, et al. *Insulin-regulated glucose uptake in rat adipocytes is mediated by two transporter isoforms present in at least two vesicle populations*. J Biol Chem **1989**;264:12358–63. PMID:2545707.
- [117] Cushman SW, Wardzala LJ. *Potential mechanism of insulin action on glucose transport in the isolated rat adipose cell. Apparent translocation of intracellular transport systems to the plasma membrane*. J Biol Chem **1980**;255:4758–62. PMID:6989818.
- [118] Karlsson HKR, Chibalin A V., Koistinen HA, Yang J, Koumanov F, Wallberg-Henriksson H, et al. *Kinetics of GLUT4 trafficking in rat and human skeletal muscle*. Diabetes **2009**;58:847–54. PMID:19188436.
- [119] Sivitz WI, DeSautel SL, Kayano T, Bell GI, Pessin JE. *Regulation of glucose transporter messenger RNA levels in rat adipose tissue by insulin*. Mol Endocrinol **1990**;4:583–8. PMID:2149165.
- [120] Ramos-Álvarez I, Moreno-Villegas Z, Martín-Duce A, Sanz R, Aparicio C, Portal-Núñez S, et al. *Human BRS-3 receptor: functions/role in cell signaling pathways and glucose metabolism in obese or diabetic myocytes*. Peptides **2014**;51:91–9. PMID:24220502.
- [121] Stenbit AE, Tsao TS, Li J, Burcelin R, Geenen DL, Factor SM, et al. *GLUT4 heterozygous knockout mice develop muscle insulin resistance and diabetes*. Nat Med **1997**;3:1096–101. PMID:9334720.
- [122] Brozinick JT, McCoid SC, Reynolds TH, Nardone NA, Hargrove DM, Stevenson RW, et al. *GLUT4 overexpression in db/db mice dose-dependently ameliorates diabetes but is not a*

- lifelong cure*. Diabetes **2001**;50:593–600. PMID:11246879.
- [123] Bryant NJ, Govers R, James DE. *Regulated transport of the glucose transporter GLUT4*. Nat Rev Mol Cell Biol **2002**;3:267–77. PMID:11994746.
 - [124] Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O. *Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin*. Proc Natl Acad Sci U S A **1995**;92:5817–21. PMID:7597034.
 - [125] Coderre L, Vallega GA, Pilch PF, Chipkin SR. *In vivo effects of dexamethasone and sucrose on glucose transport (GLUT-4) protein tissue distribution*. Am J Physiol **1996**;271:E643-8. PMID:8897851.
 - [126] Pâquet MR, Romanek RJ, Sargeant RJ. *Vanadate induces the recruitment of GLUT-4 glucose transporter to the plasma membrane of rat adipocytes*. Mol Cell Biochem **1992**;109:149–55. PMID:1625680.
 - [127] Müller G, Wied S, Crecelius A, Kessler A, Eckel J. *Phosphoinositolglycan-peptides from yeast potentially induce metabolic insulin actions in isolated rat adipocytes, cardiomyocytes, and diaphragms*. Endocrinology **1997**;138:3459–75. PMID:9231801.
 - [128] Pulido N, Romero R, Suárez AI, Rodríguez E, Casanova B, Rovira A. *Sulfonylureas stimulate glucose uptake through GLUT4 transporter translocation in rat skeletal muscle*. Biochem Biophys Res Commun **1996**;228:499–504. PMID:8920942.
 - [129] Usui I, Imamura T, Huang J, Satoh H, Olefsky JM. *Cdc42 is a Rho GTPase family member that can mediate insulin signaling to glucose transport in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem **2003**;278:13765–74. PMID:12566459.
 - [130] Kanzaki M, Watson RT, Artemyev NO, Pessin JE. *The trimeric GTP-binding protein (G(q)/G(11)) alpha subunit is required for insulin-stimulated GLUT4 translocation in 3T3L1 adipocytes*. J Biol Chem **2000**;275:7167–75. PMID:10702285.
 - [131] Patel TB. *Single transmembrane spanning heterotrimeric g protein-coupled receptors and their signaling cascades*. Pharmacol Rev **2004**;56:371–85. PMID:15317909.
 - [132] Dehvari N, Hutchinson DS, Nevzorova J, Dallner OS, Sato M, Kocan M, et al. *$\beta(2)$ -Adrenoceptors increase translocation of GLUT4 via GPCR kinase sites in the receptor C-terminal tail*. Br J Pharmacol **2012**;165:1442–56. PMID:21883150.
 - [133] Wu-Wong JR, Berg CE, Wang J, Chiou WJ, Fissel B. *Endothelin stimulates glucose uptake and GLUT4 translocation via activation of endothelin ETA receptor in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem **1999**;274:8103–10. PMID:10075711.
 - [134] Katritch V, Cherezov V, Stevens RC. *Diversity and modularity of G protein-coupled receptor structures*. Trends Pharmacol Sci **2012**;33:17–27. PMID:22032986.
 - [135] Limbird LE. *The receptor concept: a continuing evolution*. Mol Interv **2004**;4:326–36. PMID:15616162.
 - [136] Alfonzo-Méndez MA, Alcántara-Hernández R, García-Sáinz JA. *Novel Structural Approaches to Study GPCR Regulation*. Int J Mol Sci **2016**;18. PMID:28025563.
 - [137] Farran B. *An update on the physiological and therapeutic relevance of GPCR oligomers*. Pharmacol Res **2017**;117:303–27. PMID:28087443.
 - [138] Hamm HE. *The many faces of G protein signaling*. J Biol Chem **1998**;273:669–72. PMID:9422713.
 - [139] Oh DY, Olefsky JM. *G protein-coupled receptors as targets for anti-diabetic therapeutics*. Nat Rev Drug Discov **2016**;15:161–72. PMID:26822831.
 - [140] Regard JB, Kataoka H, Cano DA, Camerer E, Yin L, Zheng Y-W, et al. *Probing cell type-specific*

- functions of Gi in vivo identifies GPCR regulators of insulin secretion.* J Clin Invest **2007**;117:4034–43. PMID:17992256.
- [141] Layden B., Durai V, Lowe, Jr. WL. *G-Protein-Coupled Receptors, Pancreatic Islets, and Diabetes.* Nat Educ **2010**;3:13.
- [142] Ahren B. *Islet G protein-coupled receptors as potential targets for treatment of type 2 diabetes.* Nat Rev Drug Discov **2009**;8:369–85. PMID:19365392.
- [143] González N, Moreno P, Jensen RT. *Bombesin receptor subtype 3 as a potential target for obesity and diabetes.* Expert Opin Ther Targets **2015**;19:1153–70. PMID:26066663.
- [144] Ohki-Hamazaki H, Watase K, Yamamoto K, Ogura H, Yamano M, Yamada K, et al. *Mice lacking bombesin receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity.* Nature **1997**;390:165–9. PMID:9367152.
- [145] Ramos-Álvarez I, Martín-Duce A, Moreno-Villegas Z, Sanz R, Aparicio C, Portal-Núñez S, et al. *Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3), a novel candidate as therapeutic molecular target in obesity and diabetes.* Mol Cell Endocrinol **2013**;367:109–15. PMID:23291341.
- [146] González N, Martín-Duce A, Martínez-Arrieta F, Moreno-Villegas Z, Portal-Núñez S, Sanz R, et al. *Effect of bombesin receptor subtype-3 and its synthetic agonist on signaling, glucose transport and metabolism in myocytes from patients with obesity and type 2 diabetes.* Int J Mol Med **2015**;35:925–31. PMID:25653074.
- [147] Jensen RT, Battey JF, Spindel ER, Benya R V. *International Union of Pharmacology. LXVIII. Mammalian bombesin receptors: nomenclature, distribution, pharmacology, signaling, and functions in normal and disease states.* Pharmacol Rev **2008**;60:1–42. PMID:18055507.
- [148] Erspamer V, Erpamer GF, Inselvini M. *Some pharmacological actions of alytesin and bombesin.* J Pharm Pharmacol **1970**;22:875–6. PMID:4395815.
- [149] Erspamer V, Erspamer GF, Inselvini M, Negri L. *Occurrence of bombesin and alytesin in extracts of the skin of three European discoglossid frogs and pharmacological actions of bombesin on extravascular smooth muscle.* Br J Pharmacol **1972**;45:333–48. PMID:5048651.
- [150] Erspamer V. *Discovery, isolation, and characterization of bombesin-like peptides.* Ann N Y Acad Sci **1988**;547:3–9. PMID:3071223.
- [151] Battey J, Wada E. *Two distinct receptor subtypes for mammalian bombesin-like peptides.* Trends Neurosci **1991**;14:524–8. PMID:1726343.
- [152] Spindel ER, Giladi E, Brehm P, Goodman RH, Segerson TP. *Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor.* Mol Endocrinol **1990**;4:1956–63. PMID:1707129.
- [153] Fathi Z, Corjay MH, Shapira H, Wada E, Benya R, Jensen R, et al. *BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells.* J Biol Chem **1993**;268:5979–84. PMID:8383682.
- [154] Gorbulev V, Akhundova A, Büchner H, Fahrenholz F. *Molecular cloning of a new bombesin receptor subtype expressed in uterus during pregnancy.* Eur J Biochem **1992**;208:405–10. PMID:1325907.
- [155] Weber HC, Hampton LL, Jensen RT, Battey JF. *Structure and chromosomal localization of the mouse bombesin receptor subtype 3 gene.* Gene **1998**;211:125–31. PMID:9573346.
- [156] Hubbard TJP, Aken BL, Beal K, Ballester B, Caccamo M, Chen Y, et al. *Ensembl 2007.* Nucleic Acids Res **2007**;35:D610–7. PMID:17148474.
- [157] Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, et al. *Large-scale analysis of the human and mouse transcriptomes.* Proc Natl Acad Sci U S A **2002**;99:4465–70. PMID:11904358.

- [158] Feng Y, Guan X-M, Li J, Metzger JM, Zhu Y, Juhl K, et al. *Bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) regulates glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic islets across multiple species.* *Endocrinology* **2011**;152:4106–15. PMID:21878513.
- [159] Ryan RR, Weber HC, Mantey SA, Hou W, Hilburger ME, Pradhan TK, et al. *Pharmacology and intracellular signaling mechanisms of the native human orphan receptor BRS-3 in lung cancer cells.* *J Pharmacol Exp Ther* **1998**;287:366–80. PMID:9765358.
- [160] Mantey SA, Weber HC, Sainz E, Akeson M, Ryan RR, Pradhan TK, et al. *Discovery of a high affinity radioligand for the human orphan receptor, bombesin receptor subtype 3, which demonstrates that it has a unique pharmacology compared with other mammalian bombesin receptors.* *J Biol Chem* **1997**;272:26062–71. PMID:9325344.
- [161] Reubi JC, Wenger S, Schmuckli-Maurer J, Schaer J-C, Gugger M. *Bombesin receptor subtypes in human cancers: detection with the universal radioligand (125)I-[D-TYR(6), beta-ALA(11), PHE(13), NLE(14)] bombesin(6-14).* *Clin Cancer Res* **2002**;8:1139–46. PMID:11948125.
- [162] Fleischmann A, Waser B, Reubi JC. *Overexpression of gastrin-releasing peptide receptors in tumor-associated blood vessels of human ovarian neoplasms.* *Cell Oncol* **2007**;29:421–33. PMID:17726264.
- [163] Sayre RM, Desrochers DL, Wilson CJ, Marlowe E. *Skin type, minimal erythema dose (MED), and sunlight acclimatization.* *J Am Acad Dermatol* **1981**;5:439–43. PMID:7287960.
- [164] Pradhan TK, Katsuno T, Taylor JE, Kim SH, Ryan RR, Mantey SA, et al. *Identification of a unique ligand which has high affinity for all four bombesin receptor subtypes.* *Eur J Pharmacol* **1998**;343:275–87. PMID:9570477.
- [165] Gonzalez N, Hocart SJ, Portal-Nuñez S, Mantey SA, Nakagawa T, Zudaire E, et al. *Molecular basis for agonist selectivity and activation of the orphan bombesin receptor subtype 3 receptor.* *J Pharmacol Exp Ther* **2008**;324:463–74. PMID:18006692.
- [166] Weber D, Berger C, Eickelmann P, Antel J, Kessler H. *Design of selective peptidomimetic agonists for the human orphan receptor BRS-3.* *J Med Chem* **2003**;46:1918–30. PMID:12723954.
- [167] Zhang L, Nothacker H-P, Wang Z, Bohn LM, Civelli O. *Pharmacological characterization of a selective agonist for bombesin receptor subtype-3.* *Biochem Biophys Res Commun* **2009**;387:283–8. PMID:19580790.
- [168] Guan X-M, Chen H, Dobbelaar PH, Dong Y, Fong TM, Gagen K, et al. *Regulation of energy homeostasis by bombesin receptor subtype-3: selective receptor agonists for the treatment of obesity.* *Cell Metab* **2010**;11:101–12. PMID:20096642.
- [169] Sebhat IK, Franklin C, Lo MM-C, Chen D, Jewell JP, Miller R, et al. *Discovery of MK-5046, a Potent, Selective Bombesin Receptor Subtype-3 Agonist for the Treatment of Obesity.* *ACS Med Chem Lett* **2011**;2:43–7. PMID:24900253.
- [170] Guan X-M, Metzger JM, Yang L, Raustad KA, Wang S-P, Spann SK, et al. *Antiobesity effect of MK-5046, a novel bombesin receptor subtype-3 agonist.* *J Pharmacol Exp Ther* **2011**;336:356–64. PMID:21036912.
- [171] Reitman ML, Dishy V, Moreau A, Denney WS, Liu C, Kraft WK, et al. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of MK-5046, a bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) agonist, in healthy patients.* *J Clin Pharmacol* **2012**;52:1306–16. PMID:22162541.
- [172] Matsufuji T, Shimada K, Kobayashi S, Ichikawa M, Kawamura A, Fujimoto T, et al. *Synthesis and biological evaluation of novel chiral diazepine derivatives as bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) agonists incorporating an antedrug approach.* *Bioorg Med Chem* **2015**;23:89–104. PMID:25497965.
- [173] Matsufuji T, Shimada K, Kobayashi S, Kawamura A, Fujimoto T, Arita T, et al. *Discovery of*

- novel chiral diazepines as bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) agonists with low brain penetration.* Bioorg Med Chem Lett **2014**;24:750–5. PMID:24412111.
- [174] Alexander SP, Davenport AP, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, et al. *The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: G protein-coupled receptors.* Br J Pharmacol **2015**;172:5744–869. PMID:26650439.
- [175] Benya R V., Fathi Z, Battey JF, Jensen RT. *Serines and threonines in the gastrin-releasing peptide receptor carboxyl terminus mediate internalization.* J Biol Chem **1993**;268:20285–90. PMID:8397203.
- [176] Benya R V., Kusui T, Shikado F, Battey JF, Jensen RT. *Desensitization of neuromedin B receptors (NMB-R) on native and NMB-R-transfected cells involves down-regulation and internalization.* J Biol Chem **1994**;269:11721–8. PMID:8163469.
- [177] Majumdar ID, Weber HC. *Biology and pharmacology of bombesin receptor subtype-3.* Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes **2012**;19:3–7. PMID:22157398.
- [178] Rozengurt E. *Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors.* J Cell Physiol **2007**;213:589–602. PMID:17786953.
- [179] Ryan RR, Weber HC, Hou W, Sainz E, Mantey SA, Battey JF, et al. *Ability of various bombesin receptor agonists and antagonists to alter intracellular signaling of the human orphan receptor BRS-3.* J Biol Chem **1998**;273:13613–24. PMID:9593699.
- [180] Qin X, Qu X, Coy D, Weber HC. *A selective human bombesin receptor subtype-3 peptide agonist mediates CREB phosphorylation and transactivation.* J Mol Neurosci **2012**;46:88–99. PMID:22127929.
- [181] Jian X, Sainz E, Clark WA, Jensen RT, Battey JF, Northup JK. *The bombesin receptor subtypes have distinct G protein specificities.* J Biol Chem **1999**;274:11573–81. PMID:10206964.
- [182] Ramos-Álvarez I, Moreno P, Mantey SA, Nakamura T, Nuche-Berenguer B, Moody TW, et al. *Insights into bombesin receptors and ligands: Highlighting recent advances.* Peptides **2015**;72:128–44. PMID:25976083.
- [183] Patel M, Kawano T, Suzuki N, Hamakubo T, Karginov A V, Kozasa T. *Gα13/PDZ-RhoGEF/RhoA signaling is essential for gastrin-releasing peptide receptor-mediated colon cancer cell migration.* Mol Pharmacol **2014**;86:252–62. PMID:24958816.
- [184] Tsuda T, Kusui T, Jensen RT. *Neuromedin B receptor activation causes tyrosine phosphorylation of p125FAK by a phospholipase C independent mechanism which requires p21rho and integrity of the actin cytoskeleton.* Biochemistry **1997**;36:16328–37. PMID:9405068.
- [185] Berna MJ, Hoffmann KM, Tapia JA, Thill M, Pace A, Mantey SA, et al. *CCK causes PKD1 activation in pancreatic acini by signaling through PKC-delta and PKC-independent pathways.* Biochim Biophys Acta **2007**;1773:483–501. PMID:17306383.
- [186] Pace A, Tapia JA, Garcia-Marin LJ, Jensen RT. *The Src family kinase, Lyn, is activated in pancreatic acinar cells by gastrointestinal hormones/neurotransmitters and growth factors which stimulate its association with numerous other signaling molecules.* Biochim Biophys Acta **2006**;1763:356–65. PMID:16713446.
- [187] Moreno P, Mantey SA, Nuche-Berenguer B, Reitman ML, González N, Coy DH, et al. *Comparative pharmacology of bombesin receptor subtype-3, nonpeptide agonist MK-5046, a universal peptide agonist, and peptide antagonist Bantag-1 for human bombesin receptors.* J Pharmacol Exp Ther **2013**;347:100–16. PMID:23892571.
- [188] Moody TW, Chan D, Fahrenkrug J, Jensen RT. *Neuropeptides as autocrine growth factors in cancer cells.* Curr Pharm Des **2003**;9:495–509. PMID:12570813.

- [189] Moody TW, Mantey SA, Moreno P, Nakamura T, Lacivita E, Leopoldo M, et al. *ML-18 is a non-peptide bombesin receptor subtype-3 antagonist which inhibits lung cancer growth*. *Peptides* **2015**;64:55–61. PMID:25554218.
- [190] Moody TW, Sancho V, di Florio A, Nuche-Berenguer B, Mantey S, Jensen RT. *Bombesin receptor subtype-3 agonists stimulate the growth of lung cancer cells and increase EGF receptor tyrosine phosphorylation*. *Peptides* **2011**;32:1677–84. PMID:21712056.
- [191] Matsumoto K, Yamada K, Wada E, Hasegawa T, Usui Y, Wada K. *Bombesin receptor subtype-3 modulates plasma insulin concentration*. *Peptides* **2003**;24:83–90. PMID:12576088.
- [192] Cancelas J, Prieto PG, García-Arévalo M, Sancho V, Villanueva-Peñacarrillo ML, Malaisse WJ, et al. *Induction and reversibility of insulin resistance in rats exposed to exogenous D-fructose*. *Horm Metab Res* **2008**;40:459–66. PMID:18393174.
- [193] Escriva F, Agote M, Rubio E, Molero JC, Pascual-Leone AM, Andres A, et al. *In vivo insulin-dependent glucose uptake of specific tissues is decreased during aging of mature Wistar rats*. *Endocrinology* **1997**;138:49–54. PMID:8977384.
- [194] Prats E, Monfar M, Castellà J, Iglesias R, Alemany M. *Energy intake of rats fed a cafeteria diet*. *Physiol Behav* **1989**;45:263–72. PMID:2756013.
- [195] Portha B, Picon L, Rosselin G. *Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes*. *Diabetologia* **1979**;17:371–7. PMID:395004.
- [196] Iwase M, Kikuchi M, Nunoi K, Wakisaka M, Maki Y, Sadoshima S, et al. *Blood pressure changes in spontaneously hypertensive and normotensive rats with neonatal streptozotocin induced type 2 diabetes*. *Clin Exp Hypertens A* **1987**;9:2157–68. PMID:3436084.
- [197] Kaneko JJ, Mattheeuws D, Rottiers RP, Vermeulen A. *Glucose tolerance and insulin response in diabetes mellitus of dogs*. *J Small Anim Pract* **1978**;19:85–94. PMID:642471.
- [198] Vicent D, Villanueva-Peñacarrillo ML, Valverde I, Malaisse WJ. *Impaired in vivo insulin secretion in response to non-glucidic secretagogues in adult rats after neonatal streptozotocin*. *Acta Diabetol* **1994**;31:133–7. PMID:7827350.
- [199] Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. *Studies of the diabetogenic action of streptozotocin*. *Proc Soc Exp Biol Med* **1967**;126:201–5. PMID:4864021.
- [200] Rodbell M. *Metabolism of Isolated Fat Cells. I. Effects of Hormones on Glucose Metabolism and Lipolysis*. *J Biol Chem* **1964**;239:375–80. PMID:14169133.
- [201] Glasel JA. *Validity of nucleic acid purities monitored by 260nm/280nm absorbance ratios*. *Biotechniques* **1995**;18:62–3. PMID:7702855.
- [202] Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. *Methods* **2001**;25:402–8. PMID:11846609.
- [203] Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. *GenBank*. *Nucleic Acids Res* **2011**;39:D32–7. PMID:21071399.
- [204] Bradford MM. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem* **1976**;72:248–54. PMID:942051.
- [205] Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature* **1970**;227:680–5. PMID:5432063.
- [206] Mayor P, Maianu L, Garvey WT. *Glucose and insulin chronically regulate insulin action via different mechanisms in BC3H1 myocytes. Effects on glucose transporter gene expression*. *Diabetes* **1992**;41:274–85. PMID:1372573.

- [207] Sancho V, Trigo M V., González N, Valverde I, Malaisse WJ, Villanueva-Peñacarrillo ML. *Effects of glucagon-like peptide-1 and exendins on kinase activity, glucose transport and lipid metabolism in adipocytes from normal and type-2 diabetic rats.* J Mol Endocrinol **2005**;35:27–38. PMID:16087719.
- [208] Yamada K, Santo-Yamada Y, Wada E, Wada K. *Role of bombesin (BN)-like peptides/receptors in emotional behavior by comparison of three strains of BN-like peptide receptor knockout mice.* Mol Psychiatry **2002**;7:113–7, 6. PMID:11803457.
- [209] Yamada K, Ohki-Hamazaki H, Wada K. *Differential effects of social isolation upon body weight, food consumption, and responsiveness to novel and social environment in bombesin receptor subtype-3 (BRS-3) deficient mice.* Physiol Behav **2000**;68:555–61. PMID:10713297.
- [210] Hotta K, Matsukawa Y, Nishida M, Kotani K, Takahashi M, Kuriyama H, et al. *Mutation in bombesin receptor subtype-3 gene is not a major cause of obesity in the Japanese.* Horm Metab Res **2000**;32:33–4. PMID:10727011.
- [211] Burgering BM, Medema RH, Maassen JA, van de Wetering ML, van der Eb AJ, McCormick F, et al. *Insulin stimulation of gene expression mediated by p21ras activation.* EMBO J **1991**;10:1103–9. PMID:2022184.
- [212] Pandini G, Medico E, Conte E, Sclacca L, Vigneri R, Belfiore A. *Differential gene expression induced by insulin and insulin-like growth factor-II through the insulin receptor isoform A.* J Biol Chem **2003**;278:42178–89. PMID:12881524.
- [213] Weber HC, Walters J, Leyton J, Casibang M, Purdom S, Jensen RT, et al. *A bombesin receptor subtype-3 peptide increases nuclear oncogene expression in a MEK-1 dependent manner in human lung cancer cells.* Eur J Pharmacol **2001**;412:13–20. PMID:11166731.
- [214] Ishola TA, Kang J, Qiao J, Evers BM, Chung DH. *Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of gastrin-releasing peptide-induced cell cycle progression in neuroblastoma cells.* Biochim Biophys Acta **2007**;1770:927–32. PMID:17379415.
- [215] Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku ASK, et al. *Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 Glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism.* Curr Neurovasc Res **2008**;5:99–105. PMID:18473825.
- [216] Qiao J, Kang J, Ishola TA, Rychahou PG, Evers BM, Chung DH. *Gastrin-releasing peptide receptor silencing suppresses the tumorigenesis and metastatic potential of neuroblastoma.* Proc Natl Acad Sci U S A **2008**;105:12891–6. PMID:18753628.
- [217] Nakamichi Y, Wada E, Aoki K, Ohara-Imaizumi M, Kikuta T, Nishiwaki C, et al. *Functions of pancreatic beta cells and adipocytes in bombesin receptor subtype-3-deficient mice.* Biochem Biophys Res Commun **2004**;318:698–703. PMID:15144894.
- [218] Sancho V, Nuche B, Arnés L, Cancelas J, González N, Díaz-Miguel M, et al. *The action of GLP-1 and exendins upon glucose transport in normal human adipocytes, and on kinase activity as compared to morbidly obese patients.* Int J Mol Med **2007**. PMID:17487430.
- [219] González N, Acitores A, Sancho V, Valverde I, Villanueva-Peñacarrillo ML. *Effect of GLP-1 on glucose transport and its cell signalling in human myocytes.* Regul Pept **2005**;126:203–11. PMID:15664668.
- [220] Hoggard N, Bashir S, Cruickshank M, Miller JDB, Speakman JR. *Expression of neuromedin B in adipose tissue and its regulation by changes in energy balance.* J Mol Endocrinol **2007**;39:199–210. PMID:17766645.
- [221] González N, Mantey SA, Pradhan TK, Sancho V, Moody TW, Coy DH, et al. *Characterization of putative GRP- and NMB-receptor antagonist's interaction with human receptors.* Peptides **2009**;30:1473–86. PMID:19463875.

